

特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人

協和醗酵工業株式会社

殿

あて名

〒 100-8185

東京都千代田区大手町一丁目6番1号

ACCEPTED

RECEIVED

MAY - 2, 2001

I.P. DEPT

PCT

国際予備審査報告の送付の通知書

（法施行規則第57条）

〔PCT規則71.1〕

発送日

（日、月、年）

01.05.01

出願人又は代理人  
の書類記号

1182

重要な通知

国際出願番号

PCT/JPO0/00472

国際出願日

（日、月、年） 28.01.00

優先日

（日、月、年） 29.01.99

出願人（氏名又は名称）

協和醗酵工業株式会社

1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。

3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告（付属書類を除く）の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。

4. 注 意

出願人は、各選択官庁に対し優先日から30月以内に（官庁によってはもっと遅く）所定の手続（翻訳文の提出及び国内手数料の支払い）をしなければならない（PCT39条（1））（様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照）。

国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。

この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。

選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第II巻を参照すること。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA, JP）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特 許 庁 長 官

4B

8214

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

様式PCT/ IPEA/ 416（1992年7月）

（添付用紙の注意書きを参照）



## 注 意

### 1. 文献の写しの請求について

国際予備審査報告に記載された文献であって国際調査報告に記載されていない文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することができますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

〔申込方法〕

(1) 特許（実用新案・意匠）公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号（又は特許番号、登録番号）

○必要部数

(2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際予備審査報告の写しを添付してください（返却します）。

〔申込み及び照会先〕

〒135-0016 東京都江東区東陽4-1-7 佐藤ビル

財団法人 日本特許情報機構 情報処理部業務課

TEL 03-3508-2313

注) 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

- ### 2. 各選択官庁に対し、国際出願の写し（既に国際事務局から送達されている場合は除く）及びその所定の翻訳文を提出し、国内手数料を支払うことが必要となります。その期限については各国ごとに異なりますので注意してください。（条約第22条、第39条及び第64条(2)(a)(i)参照）





## P C T

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)

〔P C T 3 6 条及びP C T 規則70〕

出願人又は代理人 の書類記号 1182	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/00472	国際出願日 (日.月.年) 28.01.00	優先日 (日.月.年) 29.01.99
国際特許分類(IPC) Int. Cl. <sup>7</sup> C12N9/02, 1/21, 15/53, C12P7/62, 17/06		
出願人(氏名又は名称) 協 和 醗 酵 工 業 株 式 会 社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。  <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で _____ ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。  I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 18.08.00	国際予備審査報告を作成した日 19.04.01
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番8号	特許庁審査官(権限のある職員) 内 田 俊 生 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3148



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ、 図、 出願時に提出されたもの  
☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ、 図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ、 図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語
3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。
4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図
5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-39

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

25-37

有

請求の範囲

1-24, 38, 39

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-39

有

請求の範囲

無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: KUNST, F. et al., "The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*",  
Nature, November 20, 1997, Volume 390, pages 249-256

文献2: RIVOLTA, Carlo et al., "A 35.7 kb DNA fragment from the *Bacillus subtilis* chromosome containing a putative 12.3 kb operon involved in hexuronate catabolism and a perfectly symmetrical hypothetical catabolite-responsive element",  
Microbiology, April, 1998, Volume 144, Part 4, pages 877-884

文献3: EP, 649907, A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY)  
26.4月.1995 (26.04.95)

請求の範囲 1-24, 38

請求の範囲 1-24, 38に記載の発明は、国際調査報告で引用した文献1又は文献2により、進歩性を有しない。

文献1に記載された「yjiB」(GenBank Accession No. Z99110 の 96423番から97613番までの塩基配列)又は文献2に記載された「YjiB」(GenBank Accession No. AF015825 の 10583番から11773番までの塩基配列)は、いずれも本国際出願の配列番号2に記載の配列と同一であるから、そのような配列からなるDNA、該DNAにハイブリダイズするDNA、これらDNAを含む組換えベクター、これらDNAがコードする蛋白質、該組換えベクターを導入した形質転換体、該形質転換体を培養する蛋白質の製造法は、いずれも当該技術分野の専門家にとって自明である。

請求の範囲 39

請求の範囲 39に記載の発明は、文献1又は文献2により、進歩性を有しない。文献1又は文献2により公知の塩基配列の部分配列は、当該技術分野の専門家にとって自明である。



補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V 欄の続き

請求の範囲 25-37

請求の範囲 25-37 に記載の発明は、文献 1 又は文献 2、同じく国際調査報告で引用した文献 3 に対して、新規性及び進歩性を有する。

文献 1 又は文献 2 の記載により、本国際出願の配列番号 2 に記載の塩基配列が明らかであるものの、そこには該塩基配列がコードする蛋白質が具体的にどのような反応を触媒するものであるかについては記載されておらず、そのことは当該技術分野の専門家にとって自明なことでもない。また、文献 3 には、本国際出願に係る HMG-CoA レダクターゼ阻害剤の製造法におけるのと同様の原料から同様の目的物を製造するに際し、糸状菌を使用する方法が記載されているが、該反応を触媒する酵素（蛋白質）やそれをコードする DNA については、何ら具体的な開示はなされておらず、それらは当該技術分野の専門家にとって自明なことでもない。





発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

特許協力条約

LJD

JL10



出願人

協和醗酵工業株式会社

殿

あて名

〒100-8185

東京都千代田区大手町一丁目6番1号

PCT見解書

(法第13条)  
〔PCT規則66〕

発送日  
(日.月.年)

300101

出願人又は代理人  
の書類記号

1182

応答期間

上記発送日から 2 月以内

国際出願番号

PCT/JPO0/00472

国際出願日

(日.月.年)

28.01.00

優先日

(日.月.年)

29.01.99

国際特許分類 (IPC)

Int. C1<sup>7</sup> C12N9/02, 1/21, 15/53, C12P7/62, 17/06

出願人 (氏名又は名称)

協和醗酵工業株式会社

1. これは、この国際予備審査機関が作成した 1 回目の見解書である。

2. この見解書は、次の内容を含む。

I ☒ 見解の基礎

II ☐ 優先権

III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成

IV ☐ 発明の単一性の欠如

V ☒ 法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)) に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明

VI ☐ ある種の引用文献

VII ☐ 国際出願の不備

VIII ☐ 国際出願に対する意見

3. 出願人は、この見解書に回答することが求められる。

いつ?

上記応答期間を参照すること。この応答期間に間に合わないときは、出願人は、法第13条 (PCT規則66.2(d)) に規定するとおり、その期間の経過前に国際予備審査機関に期間延長を請求することができる。ただし、期間延長が認められるのは合理的な理由があり、かつスケジュールに余裕がある場合にに限られることに注意されたい。

どのように?

法第13条 (PCT規則66.3) の規定に従い、答弁書及び必要な場合には、補正書を提出する。補正書の様式及び言語については、法施行規則第62条 (PCT規則66.8及び66.9) を参照すること。

なお

補正書を提出する追加の機会については、法施行規則第61条の2 (PCT規則66.4) を参照すること。補正書及び/又は答弁書の審査官による考慮については、PCT規則66.4の2を参照すること。審査官との非公式の連絡については、PCT規則66.6を参照すること。

回答がないときは、国際予備審査報告は、この見解書に基づき作成される。

4. 国際予備審査報告作成の最終期限は、PCT規則69.2の規定により 29.05.01 である。

名称及びあて先

日本国特許庁 (IPEA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

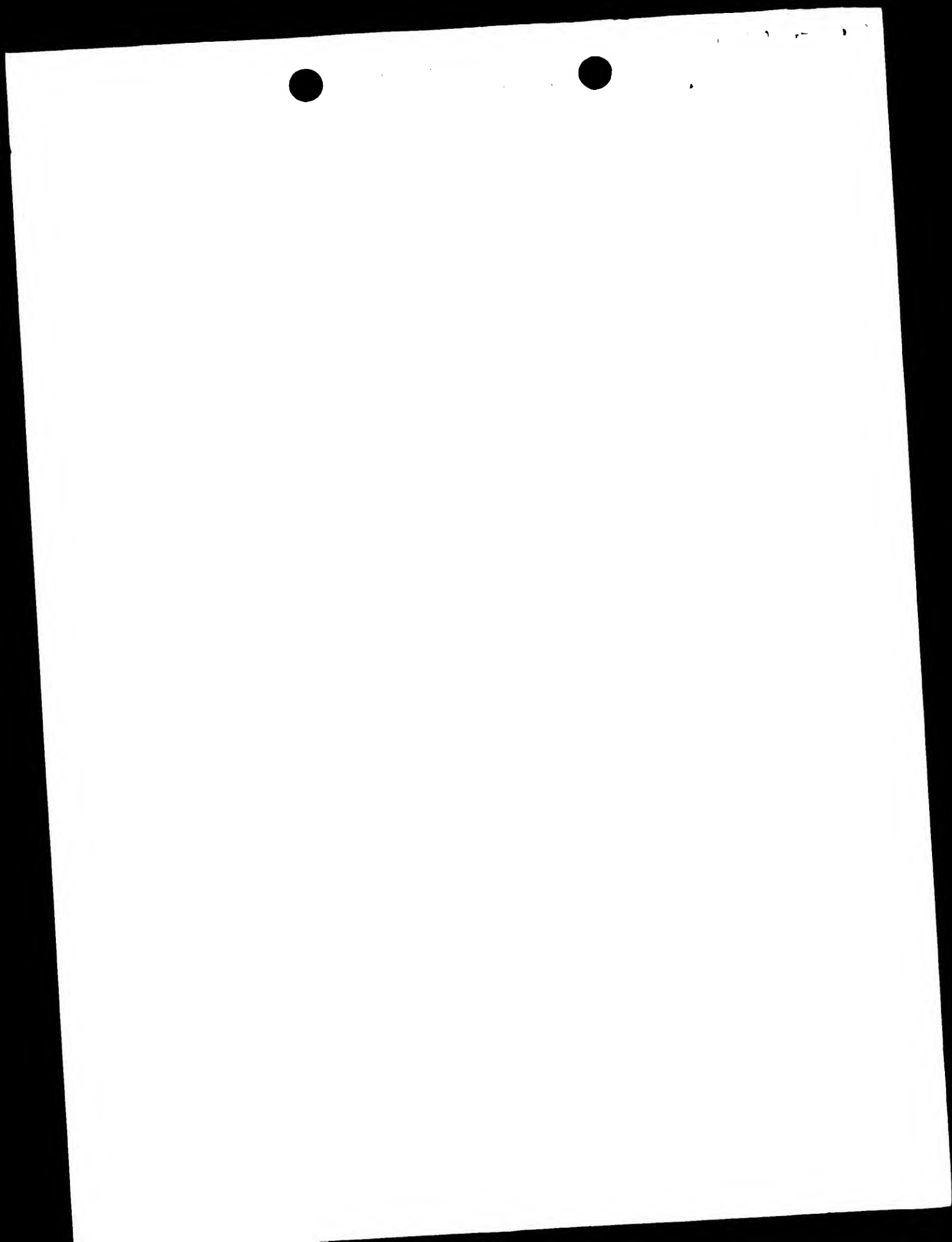
特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

4 B

8 2 1 4

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



## I. 見解の基礎

1. この見解書は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に回答するために提出された差替え用紙は、この見解書において「出願時」とする。)

☒ 出願時の国際出願書類

☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ 図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ 図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ 図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

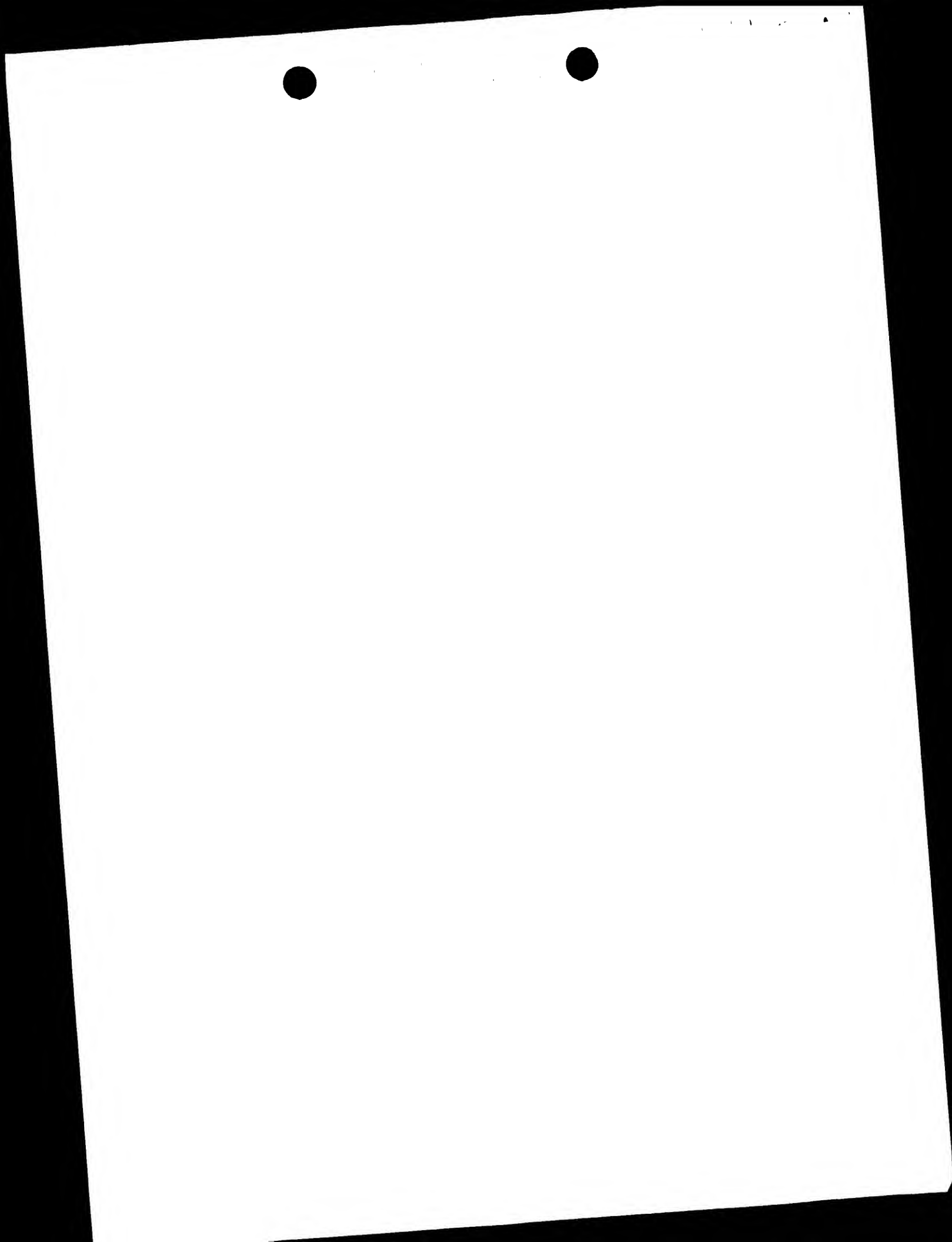
3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき見解書を作成した。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この見解書は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第13条（PCT規則66.2(a)(i)に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-39	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲	25-37	有
	請求の範囲	1-24, 38, 39	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-39	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明

文献1: KUNST, F. et al., "The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*",  
Nature, November 20, 1997, Volume 390, pages 249-256

文献2: RIVOLTA, Carlo et al., "A 35.7 kb DNA fragment from the *Bacillus subtilis* chromosome containing a putative 12.3 kb operon involved in hexuronate catabolism and a perfectly symmetrical hypothetical catabolite-responsive element",  
Microbiology, April, 1998, Volume 144, Part 4, pages 877-884

請求の範囲 1-24, 38

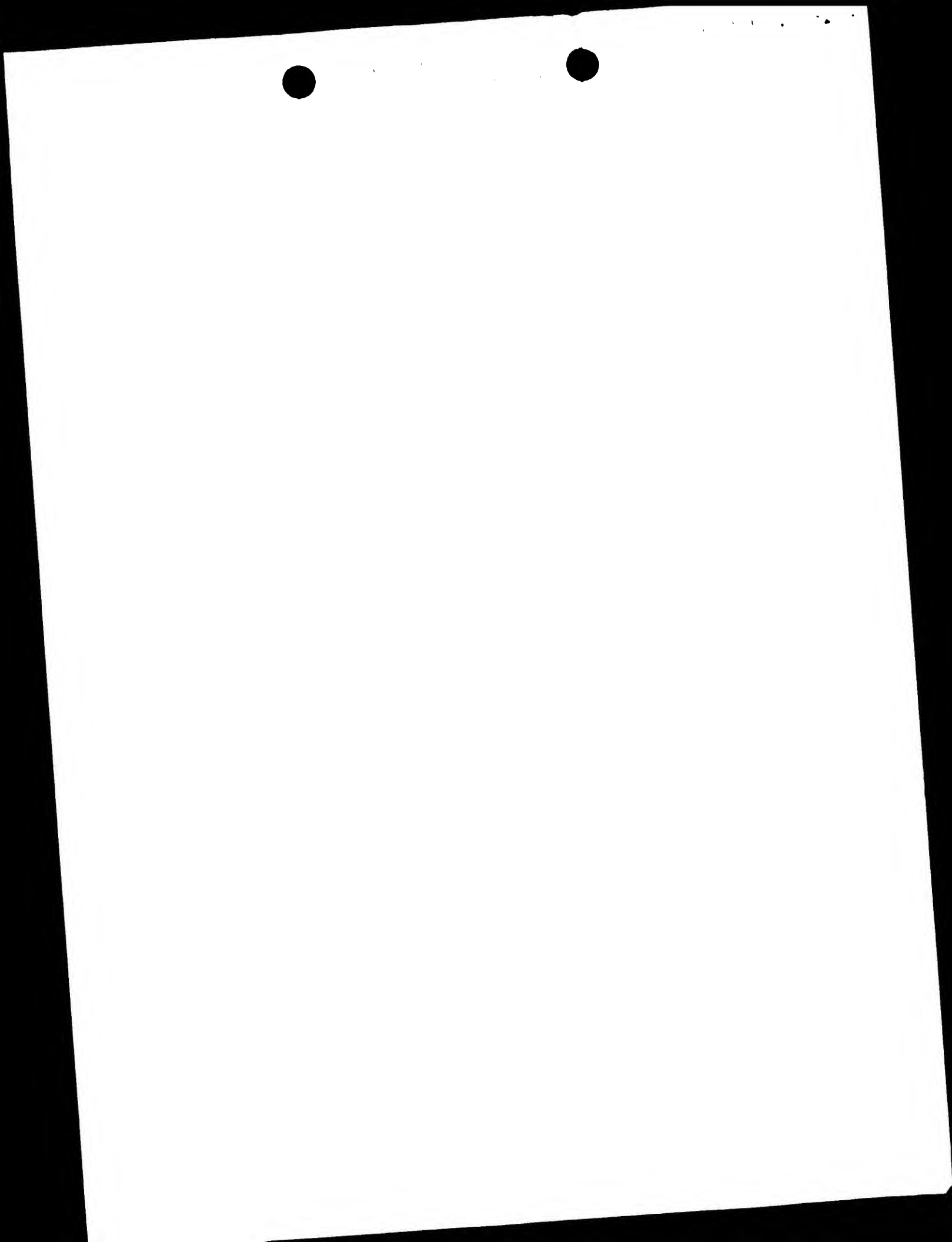
請求の範囲 1-24, 38 に記載の発明は、国際調査報告で引用した文献1又は文献2により、進歩性を有しない。

文献1に記載された「yjiB」(GenBank Accession No. Z99110 の 96423番から97613番までの塩基配列)又は文献2に記載された「YjiB」(GenBank Accession No. AF015825 の 10583番から11773番までの塩基配列)は、いずれも本国際出願の配列番号2に記載の配列と同一であるから、そのような配列からなるDNA、該DNAにハイブリダイズするDNA、これらDNAを含む組換えベクター、これらDNAがコードする蛋白質、該組換えベクターを導入した形質転換体、該形質転換体を培養する蛋白質の製造法は、いずれも当該技術分野の専門家にとって自明である。

請求の範囲 39

請求の範囲 39 に記載の発明は、文献1又は文献2により、進歩性を有しない。

文献1又は文献2により公知の塩基配列の部分配列は、当該技術分野の専門家にとって自明である。



E P



P C T

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第 40、41 条)  
[PCT 18 条、PCT 規則 43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 1182	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記 5 を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JPO0/00472	国際出願日 (日.月.年) 28.01.00	優先日 (日.月.年) 29.01.99	
出願人 (氏名又は名称) 協 和 酵 酵 工 業 株 式 会 社			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第 41 条 (PCT 18 条) の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

#### 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☐ 出願人が提出したものを承認する。

☒ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第 47 条 (PCT 規則 38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

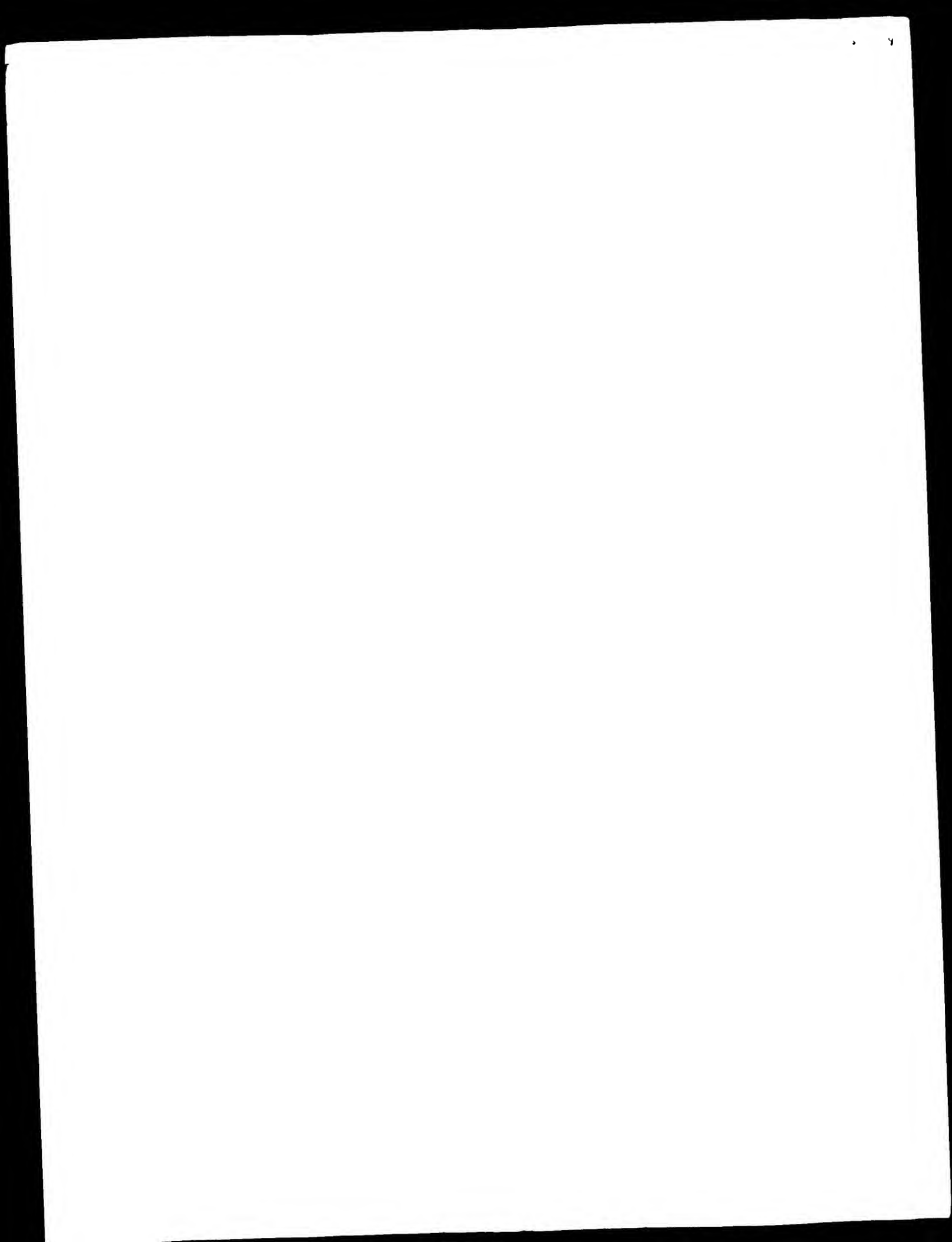
6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

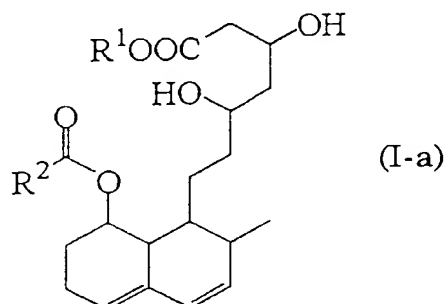
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



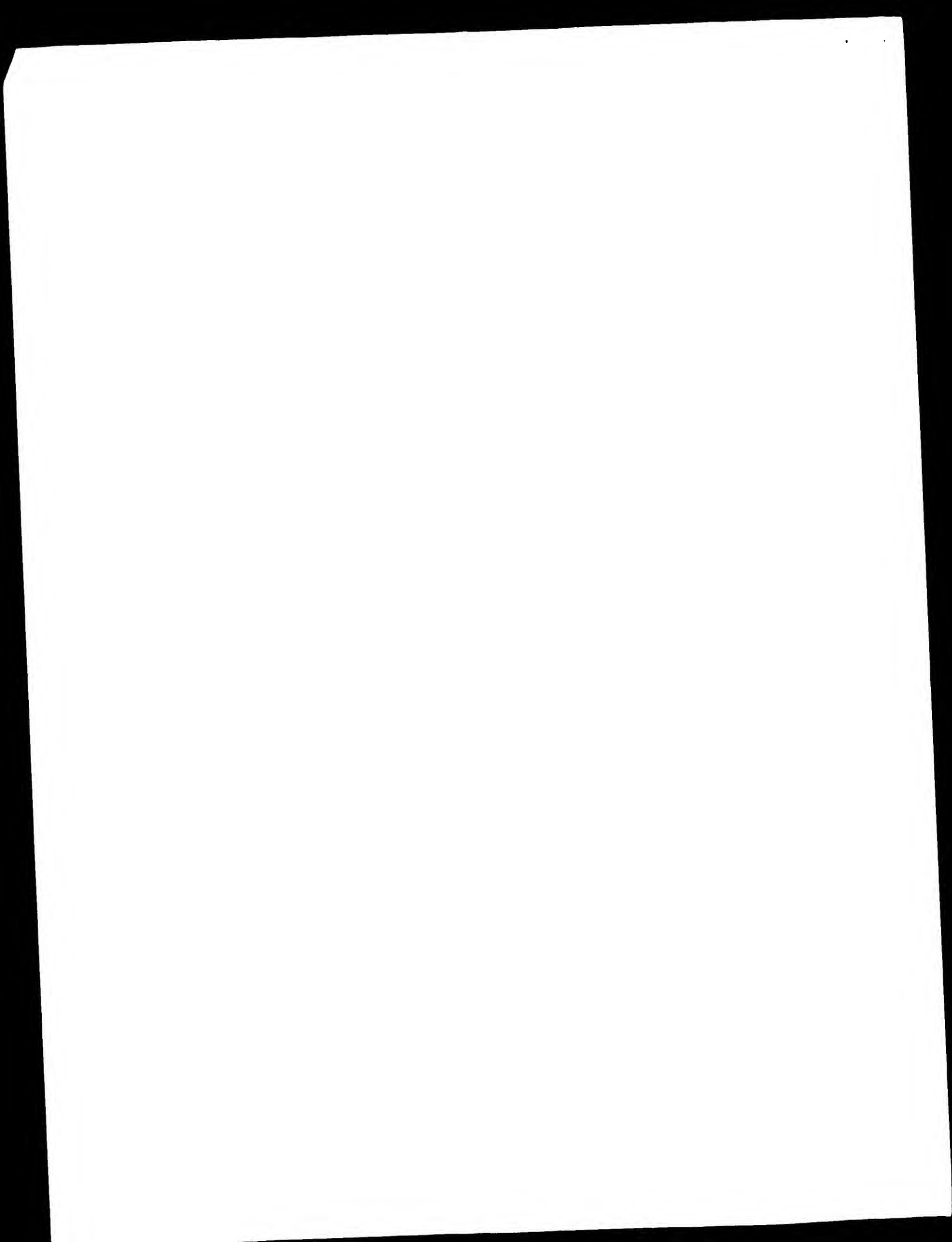


## 第III欄 要約 (第1ページの5の続き)

本願発明は、Bacillus属に属する微生物由来でかつ、一般式 (I-a)



(式中、R<sup>1</sup> は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、R<sup>2</sup> は置換もしくは非置換のアルキルまたは置換もしくは非置換のアリールを表す) で表される化合物またはその閉環ラクトン体を水酸化する活性を有する蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、該DNAを含む組換えDNA等に関する。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N9/02, 1/21, 15/53, C12P7/62, 17/06

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N9/00-9/02, 15/52-15/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq,  
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Nature, Volume 390, issued November 20, 1997, F. Kunst et al., "The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium <i>Bacillus subtilis</i> ", pages 249-256 & Database GenBank Accession No. B69851	1-24, 39
X	Microbiology, Volume 144, Part 4, issued April 1998, Cario Rivolta et al., "A 35.7 kb DNA fragment from the <i>Bacillus subtilis</i> chromosome containing a putative 12.3 kb operon involved in hexuronate catabolism and a perfectly	1-24, 39

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27.04.00

国際調査報告の発送日

16.05.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

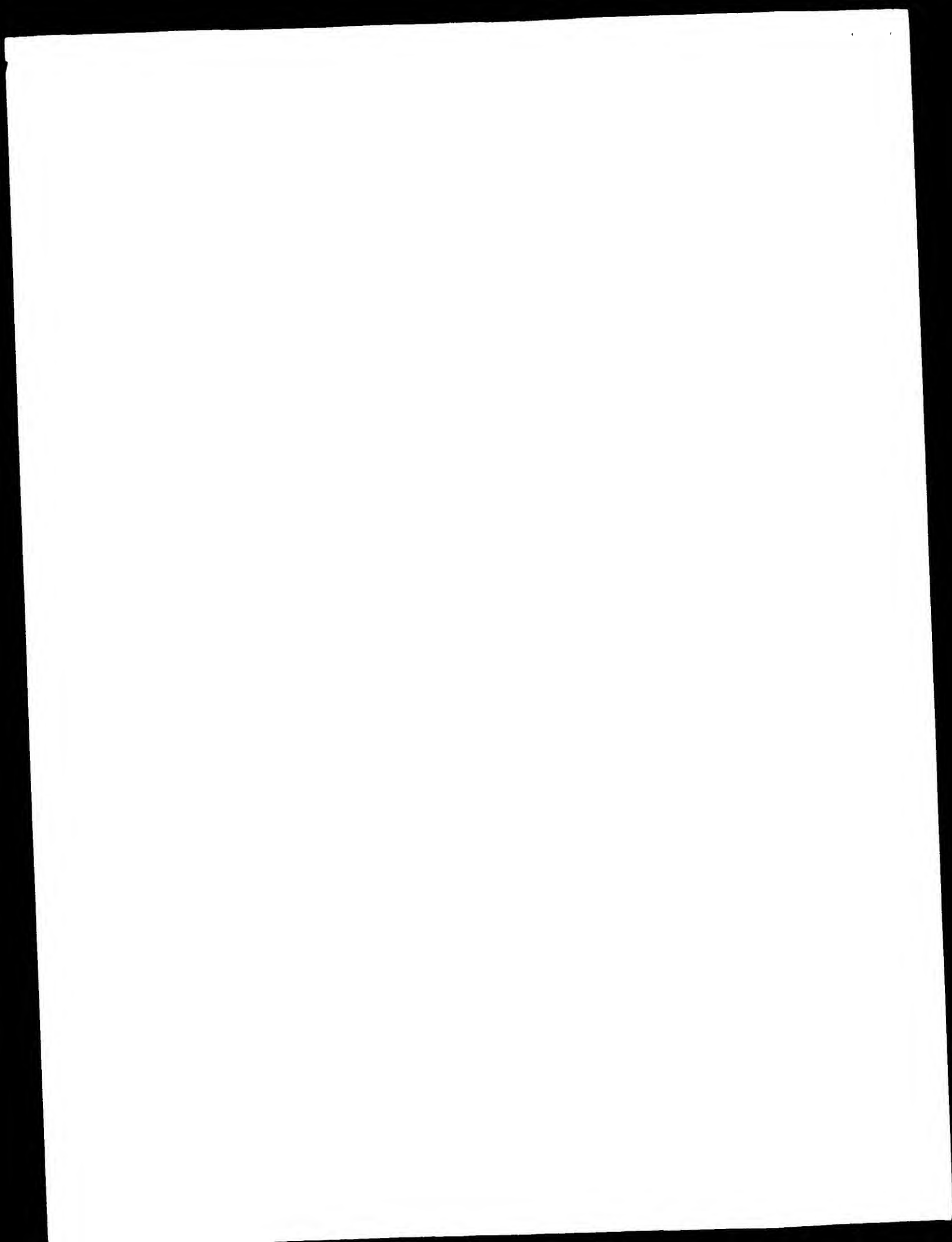
特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

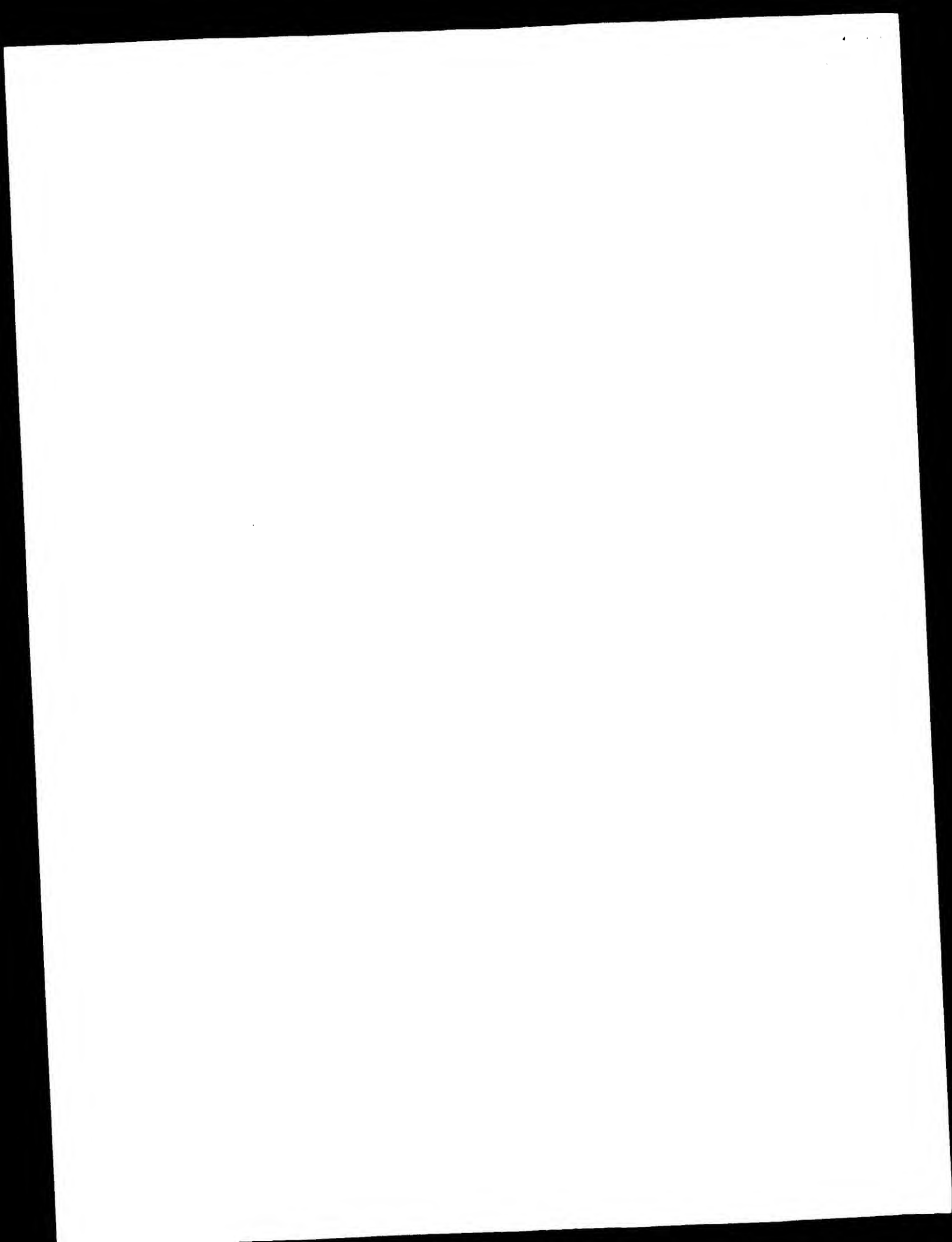
4N

8214

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



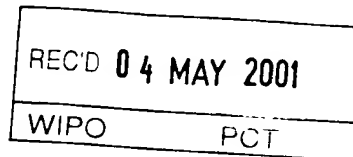
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	symmetrical hypothetical catabolite-responsive element", pages 877-884 & Database GenBank Accession No. AF015825	
A	EP, 649907, A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 26.4月.1995 (26.04.95) & HU, 217104, B & AU, 9475972, A & FI, 9404926, A & CA, 2134025, A & JP, 7-184670, A & CN, 1106067, A & IL, 111084, A & SG, 47504, A1	1-39
A	JP, 64-2585, A (三共株式会社) 6.1月.1989 (06.01.89) (ファミリーなし)	1-39
A	Cardiology, Volume 77, Supplement 4, issued October 1990, Alfred W. Alberts, "Lovastatin and Simvastatin - Inhibitors of HMG CoA Reductase and Cholesterol Biosynthesis", pages 14-21	1-39
A	The Journal of Antibiotics, Volume 29, Number 12, issued December 1976, Akira Endo et al., "ML-236A, ML-236B, AND ML-236C, NEW INHIBITORS OF CHOLESTEROGENESIS PRODUCED BY <i>PENICILLIUM CITRINUM</i> ", pages 1346-1348	1-39



PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
〔PCT36条及びPCT規則70〕

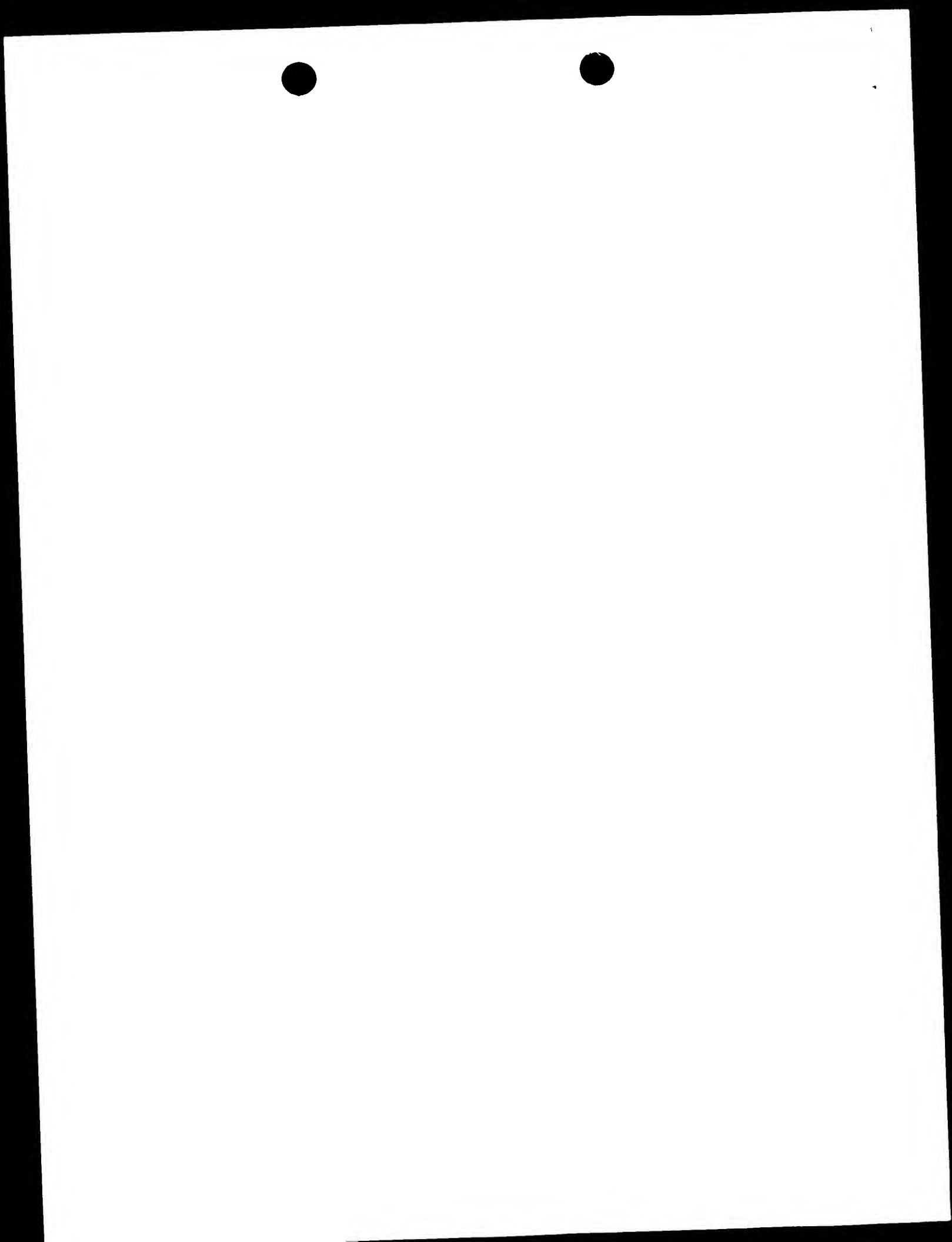


出願人又は代理人 の書類記号 1182	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/00472	国際出願日 (日.月.年) 28.01.00	優先日 (日.月.年) 29.01.99
国際特許分類 (IPC) Int. Cl <sup>7</sup> C12N9/02, 1/21, 15/53, C12P7/62, 17/06		
出願人 (氏名又は名称) 協 和 醗 酵 工 業 株 式 会 社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ ~~PCT~~ 35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 18.08.00	国際予備審査報告を作成した日 19.04.01	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 内 田 俊 生 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 8214





## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

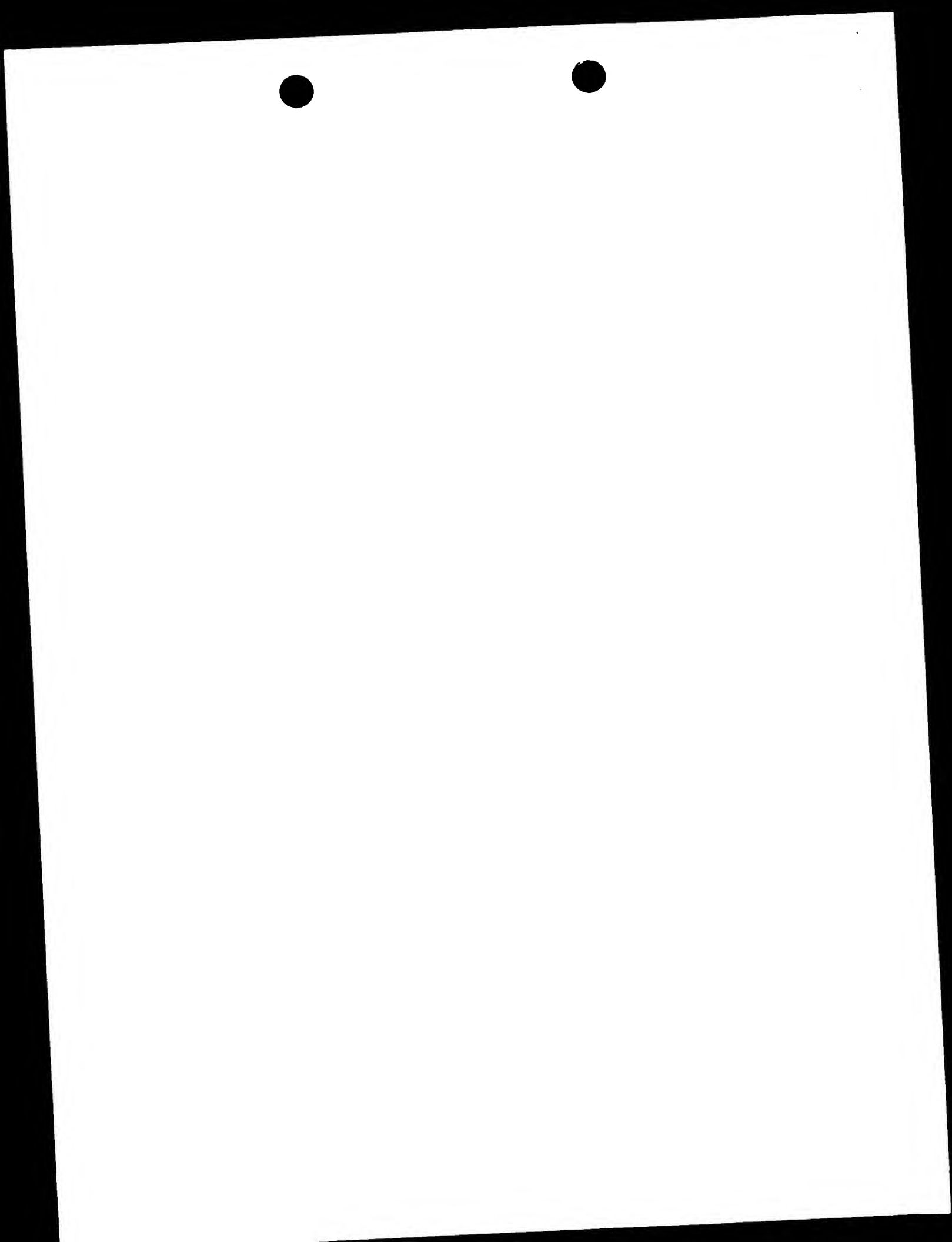
3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願前に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-39	有
	請求の範囲		無
進歩性(IS)	請求の範囲	25-37	有
	請求の範囲	1-24, 38, 39	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-39	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: KUNST, F. et al., "The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*",

Nature, November 20, 1997, Volume 390, pages 249-256

文献2: RIVOLTA, Carlo et al., "A 35.7 kb DNA fragment from the *Bacillus subtilis* chromosome containing a putative 12.3 kb operon involved in hexuronate catabolism and a perfectly symmetrical hypothetical catabolite-responsive element",

Microbiology, April, 1998, Volume 144, Part 4, pages 877-884

文献3: EP, 649907, A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY)

26.4月.1995 (26.04.95)

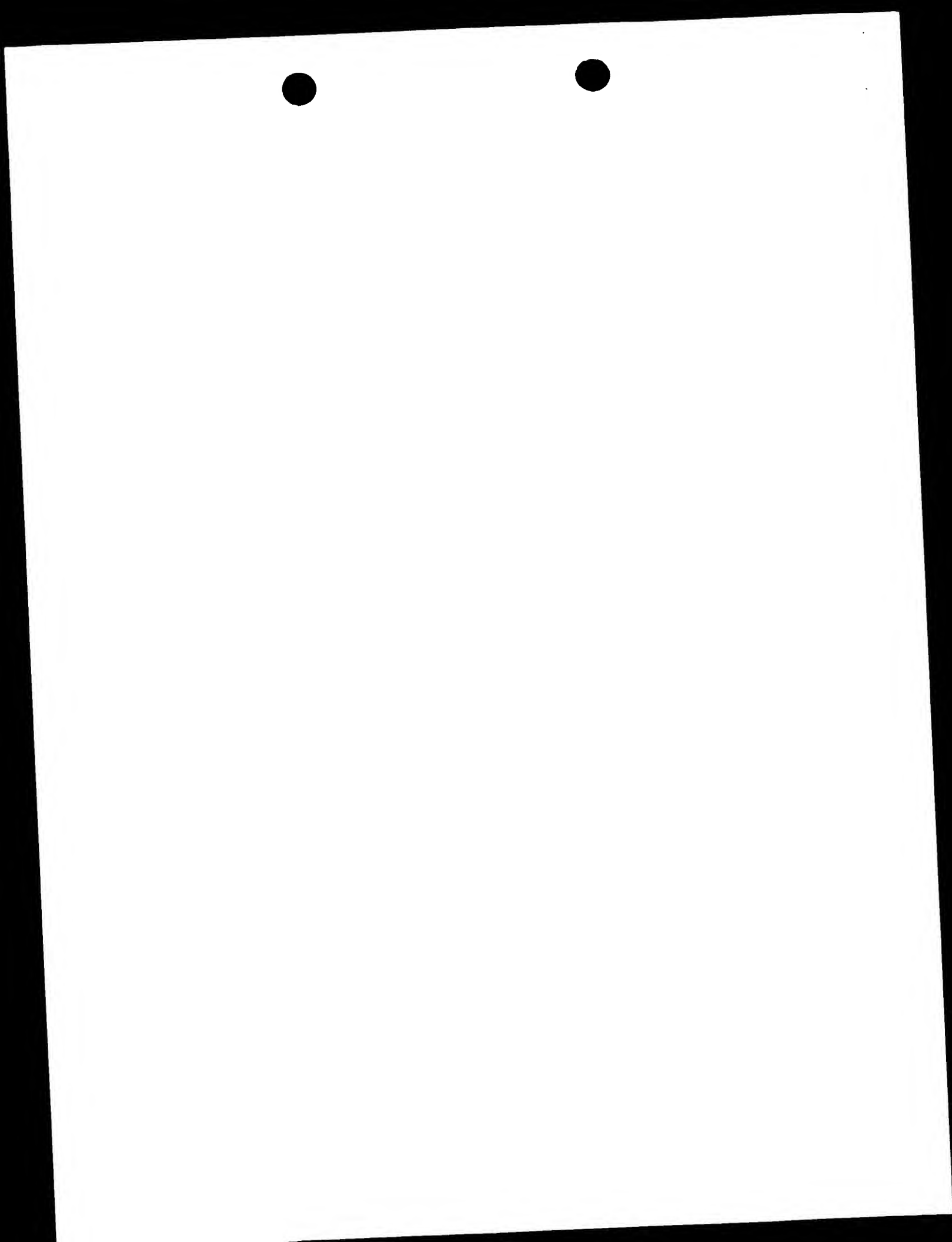
請求の範囲1-24, 38

請求の範囲1-24, 38に記載の発明は、国際調査報告で引用した文献1又は文献2により、進歩性を有しない。

文献1に記載された「yjiB」(GenBank Accession No. Z99110 の96423番から97613番までの塩基配列)又は文献2に記載された「YjiB」(GenBank Accession No. AF015825 の10583番から11773番までの塩基配列)は、いずれも本国際出願の配列番号2に記載の配列と同一であるから、そのような配列からなるDNA、該DNAにハイブリダイズするDNA、これらDNAを含む組換えベクター、これらDNAがコードする蛋白質、該組換えベクターを導入した形質転換体、該形質転換体を培養する蛋白質の製造法は、いずれも当該技術分野の専門家にとって自明である。

請求の範囲39

請求の範囲39に記載の発明は、文献1又は文献2により、進歩性を有しない。文献1又は文献2により公知の塩基配列の部分配列は、当該技術分野の専門家にとって自明である。



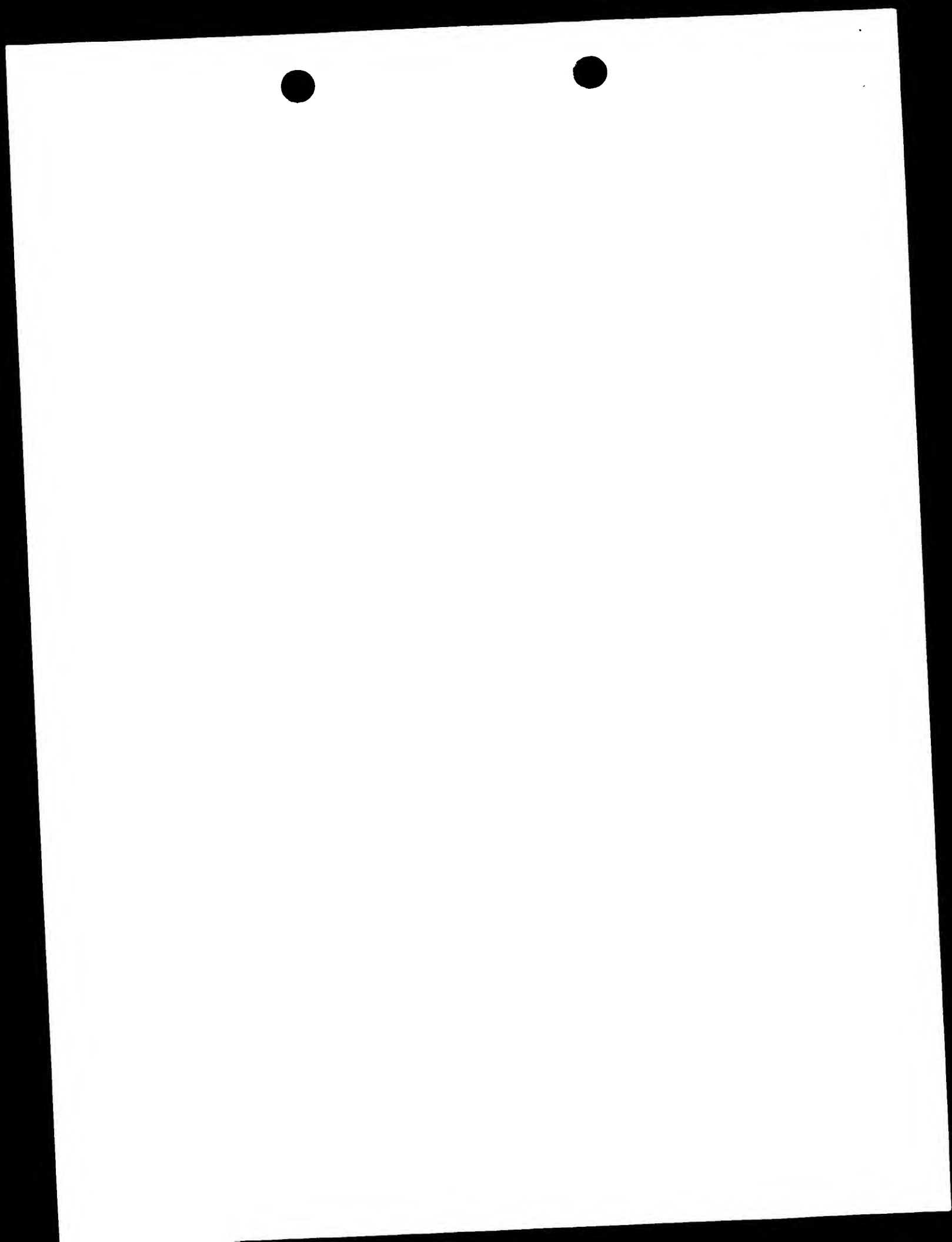
補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

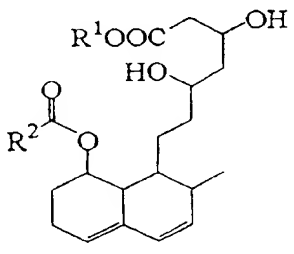
## 第 V 欄の続き

請求の範囲 25-37

請求の範囲 25-37 に記載の発明は、文献 1 又は文献 2、同じく国際調査報告で引用した文献 3 に対して、新規性及び進歩性を有する。

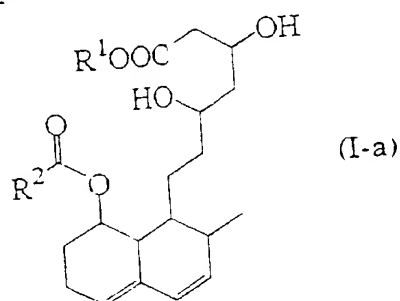
文献 1 又は文献 2 の記載により、本国際出願の配列番号 2 に記載の塩基配列が明らかであるものの、そこには該塩基配列がコードする蛋白質が具体的にどのような反応を触媒するものであるかについては記載されておらず、そのことは当該技術分野の専門家にとって自明なことでもない。また、文献 3 には、本国際出願に係る HMG-CoA レダクターゼ阻害剤の製造法におけるのと同様の原料から同様の目的物を製造するに際し、糸状菌を使用する方法が記載されているが、該反応を触媒する酵素 (蛋白質) やそれをコードする DNA については、何ら具体的な開示はなされておらず、それらは当該技術分野の専門家にとって自明なことでもない。



(51) 国際特許分類7 <b>C12N 9/02, 1/21, 15/53, C12P 7/62, 17/06</b>	<b>A1</b>	(11) 国際公開番号 <b>WO00/44886</b>  (43) 国際公開日 2000年8月3日(03.08.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/00472  (22) 国際出願日 2000年1月28日(28.01.00)  (30) 優先権データ 特願平11/21707 1999年1月29日(29.01.99) 29 July 01/30 Nov 99 JP  (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 協和醗酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)(JP/JP) 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 遠藤博文(ENDO, Hirofumi)(JP/JP) 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP) 米谷良之(YONE-TANI, Yoshiyuki)(JP/JP) 溝口 寛(MIZOGUCHI, Hiroshi)(JP/JP) 橋本信一(HASHIMOTO, Shin-ichi)(JP/JP) 〒194-8533 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo, (JP) 尾崎明夫(OZAKI, Akio)(JP/JP) 〒747-8522 山口県防府市協和町1番1号 協和醗酵工業株式会社 技術研究所内 Yamaguchi, (JP)		(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)  添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: <b>PROCESS FOR PRODUCING HMG-CoA REDUCTASE INHIBITOR</b>  (54)発明の名称 <b>HMG-CoA レダクターゼ阻害剤の製造法</b>  <div style="text-align: center;">  <p>(Ia)</p> </div>  (57) Abstract A protein having an activity of hydroxylating compounds originating in a microorganism belonging to the genus <i>Bacillus</i> and represented by general formula (I-a) or lactones formed by cyclizing these compounds; a DNA encoding this protein; a recombinant DNA containing this DNA; etc.; in formula (I-a) R <sup>1</sup> represents hydrogen, optionally substituted alkyl or an alkali metal; and R <sup>2</sup> represents optionally substituted alkyl or optionally substituted aryl.		

(57)要約

本願発明は、Bacillus属に属する微生物由来でかつ、一般式 (I-a)



(式中、 $R^1$  は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、 $R^2$  は置換もしくは非置換のアルキルまたは置換もしくは非置換のアリールを表す) で表される化合物またはその閉環ラクトン体を水酸化する活性を有する蛋白質、該蛋白質をコードする DNA、該 DNA を含む組換え DNA 等に関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリランカ	SI	スロベニア
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SK	スロバキア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GD	グレンダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BB	バルバドス	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BE	ベルギー	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TG	トーゴ
BF	ブルキナ・ファソ	GM	ガンビア	MC	モナコ	TJ	タジキスタン
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TM	トルクメニスタン
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	TR	トルコ
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TT	トリニダード・トバゴ
BY	ベラルーシ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CA	カナダ	IE	アイルランド	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CF	中央アフリカ	IL	イスラエル	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CG	コンゴ	IN	インド	MW	マラウイ	US	米国
CH	スイス	IT	イタリア	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CI	コートジボワール	IS	アイスランド	MZ	モザンビーク	VN	ベトナム
CM	カメルーン	JP	日本	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CN	中国	KE	ケニア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CR	コスタ・リカ	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CU	キューバ	KP	北朝鮮	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KR	韓国	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ			RO	ルーマニア		
DE	ドイツ						
DK	デンマーク						



# 明 細 書

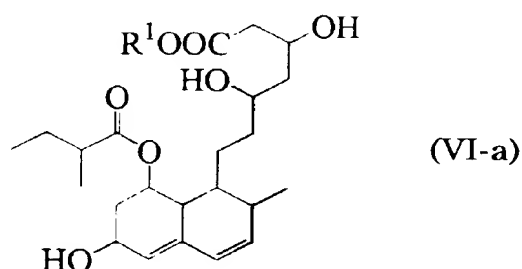
## HMG-CoAレダクターゼ阻害剤の製造法

### 技術分野

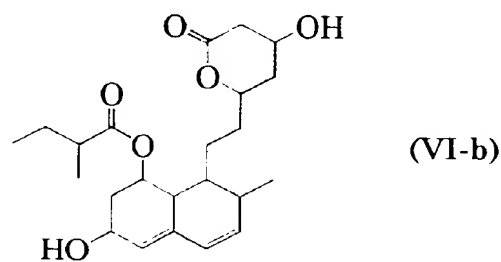
本願発明は、ヒドロキシメチルグルタリルCoA (HMG-CoA) レダクターゼを阻害し、血清コレステロールの低下作用を有する化合物の製造に関わるDNAおよび該DNAを用いた該化合物の製造法に関する。

### 背景技術

一般式 (VI-a)

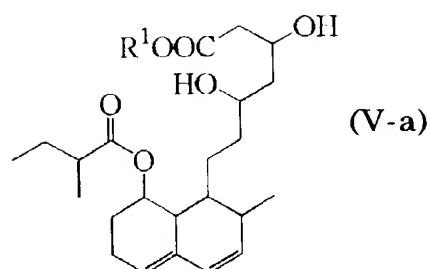


(式中、 $R^1$ は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表す) で表される化合物 [以下、化合物(VI-a)という] または一般式 (VI-b)

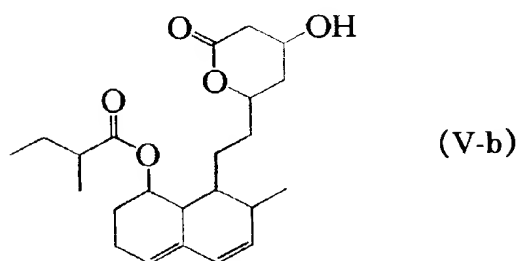


で表される、化合物 (VI-a) のラクトン体 [以下、化合物 (VI-b) という] は、HMG-CoAレダクターゼを阻害し、血清コレステロールの低下作用等を示すことが知られている [ザ・ジャーナル・オブ・アンチビオチクス (The Journal of Antibiotics) 29, 1346(1976)]。

微生物によって、一般式 (V-a)



(式中、R<sup>1</sup> 前記と同義) で表される化合物 [以下、化合物 (V-a) という] または一般式 (V-b)



で表される、化合物 (V-a) のラクトン体 [以下、化合物 (V-b) という] から化合物 (VI-a) または化合物 (VI-b) を生成する方法に関しては既に幾つかの報告がある。

即ち、[特開昭57-50894]には糸状菌を用いる方法が、[特開平7-184670][W096/40863]には放線菌を用いる方法が、また[特許第2672551号]には遺伝子組換え放線菌を用いる方法が述べられている。しかし、よく知られているように糸状菌や放線菌は菌糸を伸ばして成長するため、発酵槽で増殖させると培養液の粘度が上昇する。

このため培養液中の酸素が不足しやすく、培養液が不均一になるため反応効率の低下を招きやすい。この酸素不足を解消し、培養液を均一に保つためには、発酵槽の攪拌速度を上げなければならないが、攪拌速度を上げると菌糸が剪断され、微生物の活性が低下しやすい[発酵工学の基礎、p169~190, P.F. Stansbury, A. Whitaker 著、学会出版センター

(1988)]。

### 発明の開示

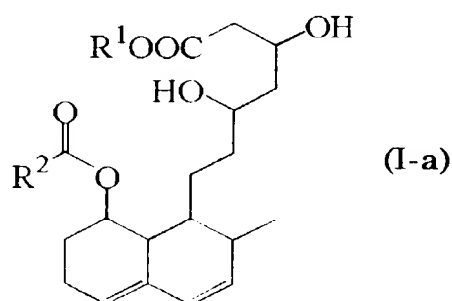
本願発明の目的は、新規な水酸化酵素をコードするDNA、およびヒドロキシメチルグルタリルCoA (HMG-CoA) レダクターゼを阻害し、血清コレステロールの低下作用を有する化合物の工業的に有利な製造法を提供することにある。

本願発明者らは、菌糸を形成しない微生物により、化合物(I-a)または化合物(I-b)の水酸化を行うことができれば、菌糸形成による培養液の不均一化にともなう反応効率の低下等の不都合を回避できるので工業的に有利であると考えた。そこで、鋭意検討した結果、本願発明を完成するに至った。

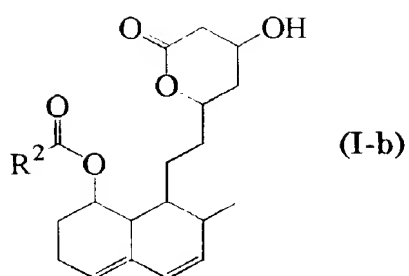
即ち、本願発明は、以下(1)～(39)に関する。

以下の一般式中では特に断らない限り、 $R^1$ は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、 $R^2$ は置換もしくは非置換のアルキルまたは置換もしくは非置換のアリールを表す。

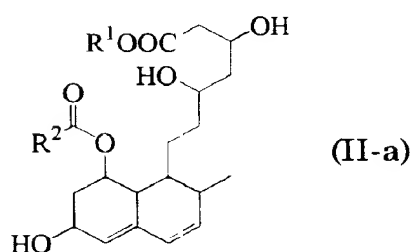
(1) Bacillus属に属する微生物由来の蛋白質であり、かつ一般式(I-a)



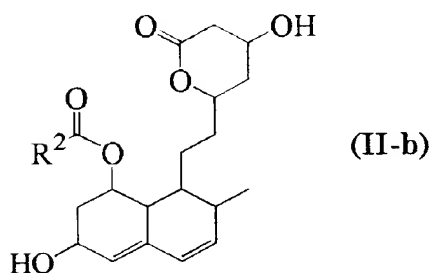
で表される化合物〔以下、化合物(I-a)という〕または一般式(I-b)



で表される、化合物 (I-a) のラクトン体 [以下、化合物 (I-b) という] から、一般式 (II-a)

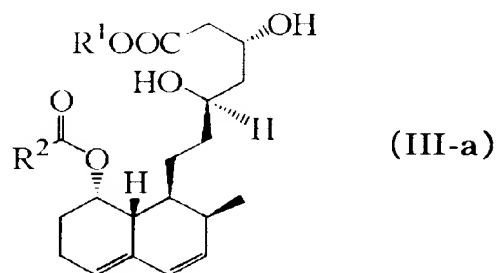


で表される化合物 [以下、化合物 (II-a) という] または一般式 (II-b)

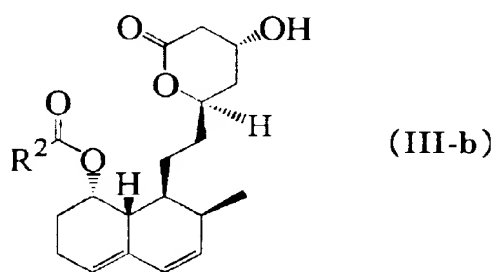


で表される、化合物 (II-a) のラクトン体 [以下、化合物 (II-b) という] を生成する活性を有する蛋白質。

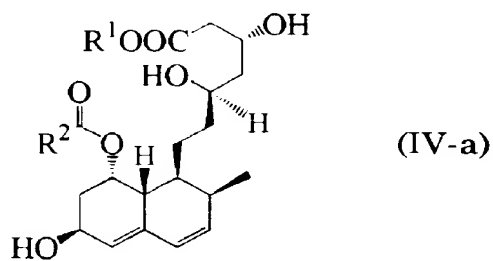
(2) Bacillus属に属する微生物由来の蛋白質であり、かつ一般式 (III-a)



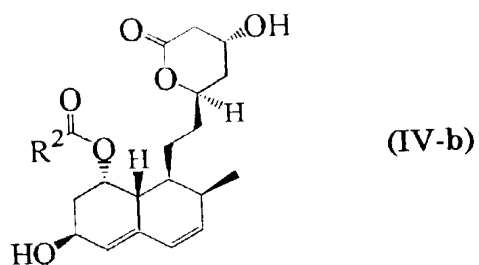
で表される化合物〔以下、化合物(III-a)という〕または一般式(III-b)



で表される、化合物(III-a)のラクトン体〔以下、化合物(III-b)という〕から、一般式(IV-a)



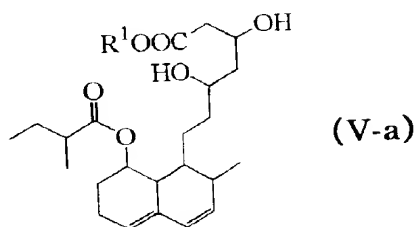
で表される化合物〔以下、化合物(IV-a)という〕または一般式(IV-b)



(IV-b)

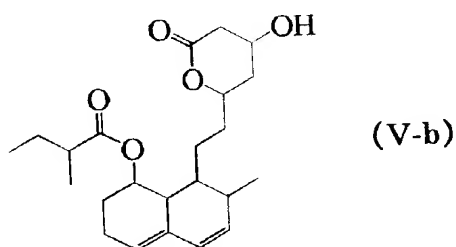
で表される、化合物 (IV-a) のラクトン体 [以下、化合物 (IV-b) という] を生成する活性を有する蛋白質。

(3) Bacillus 属に属する微生物由来の蛋白質であり、かつ一般式 (V-a)



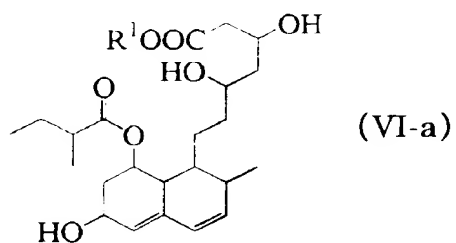
(V-a)

で表される化合物 [以下、化合物 (V-a) という] または一般式 (V-b)

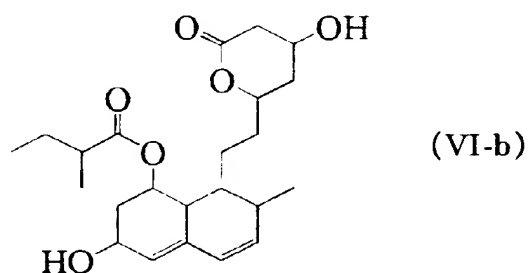


(V-b)

で表される、化合物 (V-a) のラクトン体 [以下、化合物 (V-b) という] から、一般式 (VI-a)

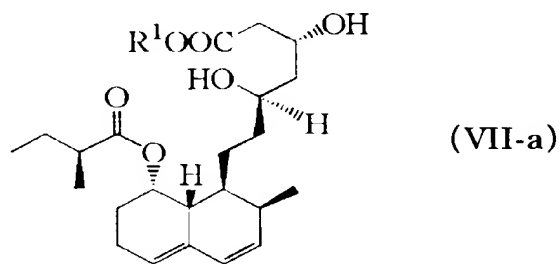


で表される化合物〔以下、化合物 (VI-a) という〕または一般式 (VI-b)

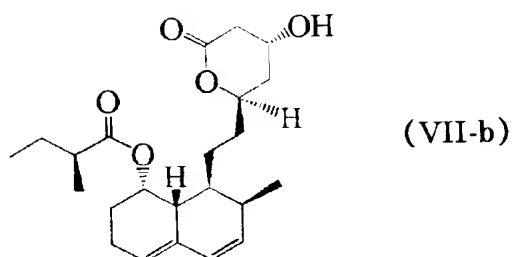


で表される、化合物 (VI-a) のラクトン体〔以下、化合物 (VI-b) という〕を生成する活性を有する蛋白質。

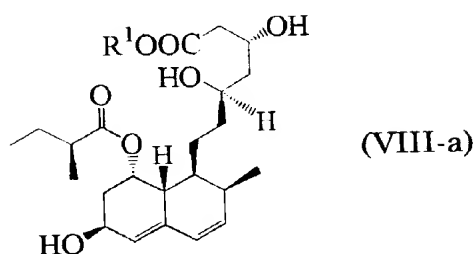
(4) Bacillus属に属する微生物由来の蛋白質であり、かつ一般式 (VII-a)



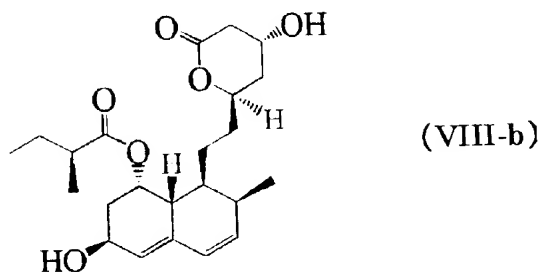
で表される化合物〔以下、化合物 (VII-a) という〕または一般式 (VII-b)



で表される、化合物 (VII-a) のラクトン体 [以下、化合物 (VII-b) という] から、一般式 (VIII-a)



で表される化合物[以下、化合物(VIII-a)という]または一般式(VIII-b)



で表される、化合物 (VIII-a) のラクトン体 [以下、化合物 (VIII-b) という] を生成する活性を有する蛋白質。

(5) Bacillus属に属する微生物がB. subtilis、B. megaterium、B. laterosporus、B. sphaericus、B. pumilus、B. stearothermophilus、B. cereus、B. badius、B. brevis、B. alvei、B. circulans、および B. maceransから選ばれる微生物である、上記 (1) ~ (4) いずれか 1 つに記載の蛋白質。



(6) Bacillus属に属する微生物がB. subtilis ATCC6051株、B. megaterium ATCC10778株、B. megaterium ATCC11562株、B. megaterium ATCC13402株、B. megaterium ATCC15177株、B. megaterium ATCC15450株、B. megaterium ATCC19213株、B. megaterium IAM1032株、B. laterosporus ATCC4517株、B. pumilus FERM BP-2064株、B. badius ATCC14574株、B. brevis NRRL B-8029株、B. alvei ATCC6344株、B. circulans NTCT-2610株、およびB. macerans NCIMB-9368株から選ばれる微生物である、上記(1)～(5)いずれか1つに記載の蛋白質。

(7) Bacillus属に属する微生物がBacillus sp. FERM BP-6029株、およびBacillus sp. FERM BP-6030株から選ばれる微生物である、上記(1)～(5)いずれか1つに記載の蛋白質。

(8) 配列番号1記載のアミノ酸配列を有する蛋白質。

(9) 配列番号1記載のアミノ酸配列から1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有し、かつ化合物(I-a)または化合物(I-b)から化合物(II-a)または化合物(II-b)を生成する活性を有する蛋白質。

(10) 蛋白質が、配列番号42又は45記載のアミノ酸配列を有する、上記(9)の蛋白質。

(11) 化合物(I-a)が化合物(III-a)であり、化合物(I-b)が化合物(III-b)であり、化合物(II-a)が化合物(IV-a)であり、化合物(II-b)が化合物(IV-b)である、上記(9)の蛋白質。

(12) 化合物(I-a)が化合物(V-a)であり、化合物(I-b)が化合物(V-b)であり、化合物(II-a)が化合物(VI-a)であり、化合物(II-b)が化合物(VI-b)である、上記(9)の蛋白質。

(13) 化合物(I-a)が化合物(VII-a)であり、化合物(I-b)が化合物(VII-b)であり、化合物(II-a)が化合物(VIII-a)であり、化合物(II-b)が化合物(VIII-b)である、上記(9)の蛋白質。

(14) 配列番号2記載の塩基配列を有する、単離されたDNA。

(15) 上記(14)のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ化合物(I-a)または化合物(I-b)から化合物(II-a)または化合物(II-b)を生成する活性を有する蛋白質をコードする、単離されたDNA。

(16) DNAが、配列番号41、43および44記載の塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を有する、上記(15)のDNA。

(17) 上記(1)～(12)のいずれか1つに記載の蛋白質をコードする単離されたDNA。

(18) 化合物(I-a)が化合物(III-a)であり、化合物(I-b)が化合物(III-b)であり、化合物(II-a)が化合物(IV-a)であり、化合物(II-b)が化合物(IV-b)である、上記(15)のDNA。

(19) 化合物(I-a)が化合物(V-a)であり、化合物(I-b)が化合物(V-b)であり、化合物(II-a)が化合物(VI-a)であり、化合物(II-b)が化合物(VI-b)である、上記(15)のDNA。

(20) 化合物(I-a)が化合物(VII-a)であり、化合物(I-b)が化合物(VII-b)であり、化合物(II-a)が化合物(VIII-a)であり、化合物(II-b)が化合物(VIII-b)である、上記(15)のDNA。

(21) 上記(14)～(20)のいずれか1つに記載のDNAを含む組換えDNAベクター。

(22) 上記(21)の組換えDNAベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

(23) 形質転換体がEscherichia属、Bacillus属、Corynebacterium属、およびStreptomyces属から選ばれる微生物に属する、上記(22)の形質転換体。

(24) 形質転換体がEscherichia coli、Bacillus subtilis、Bacillus megaterium、Corynebacterium glutamicum、Corynebacterium

ammoniagenes、Corynebacterium callunaeおよびStreptomyces lividansから選ばれる微生物に属する微生物である、上記(22)または(23)の形質転換体。

(25) 上記(22)～(24)のいずれか1つに記載の形質転換体、該形質転換体の培養物または該培養物の処理物を酵素源として用い、化合物(I-a)または化合物(I-b)を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に化合物(II-a)または化合物(II-b)を生成、蓄積させ、該水性媒体から化合物(II-a)または化合物(II-b)を採取することを特徴とする、化合物(II-a)または化合物(II-b)の製造法。

(26) 上記(22)～(24)のいずれか1つに記載の形質転換体、該形質転換体の培養物または該培養物の処理物を酵素源として用い、化合物(III-a)または化合物(III-b)を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に化合物(IV-a)または化合物(IV-b)を生成、蓄積させ、該水性媒体から化合物(IV-a)または化合物(IV-b)を採取することを特徴とする、化合物(IV-a)または化合物(IV-b)の製造法。

(27) 上記(22)～(24)のいずれか1つに記載の形質転換体、該形質転換体の培養物または該培養物の処理物を酵素源として用い、化合物(V-a)または化合物(V-b)を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に化合物(VI-a)または化合物(VI-b)を生成、蓄積させ、該水性媒体から化合物(VI-a)または化合物(VI-b)を採取することを特徴とする、化合物(VI-a)または化合物(VI-b)の製造法。

(28) 上記(22)～(24)のいずれか1つに記載の形質転換体、該形質転換体の培養物または該培養物の処理物を酵素源として用い、化合物(VII-a)または化合物(VII-b)を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に化合物(VIII-a)または化合物(VIII-b)を生成、蓄積させ、該水性媒体から化合物(VIII-a)または化合物(VIII-b)を採取することを特徴とする、化合物(VIII-a)または化合物(VIII-b)の製造法。

(29) 化合物(II-b)が、化合物(II-a)よりラク톤を形成させて得られた化合物(II-b)である、上記(25)の製造法。

(30) 化合物(II-a)が、化合物(II-b)のラク톤を開環させて得られた化合物(II-a)である、上記(25)の製造法。

(31) 化合物(IV-b)が、化合物(IV-a)よりラク톤を形成させて得られた化合物(IV-b)である、上記(26)の製造法。

(32) 化合物(IV-a)が、化合物(IV-b)のラク톤を開環させて得られた化合物(IV-a)である、上記(26)の製造法。

(33) 化合物(VI-b)が、化合物(VI-a)よりラク톤を形成させて得られた化合物(VI-b)である、上記(27)の製造法。

(34) 化合物(VI-a)が、化合物VI-bのラク톤を開環させて得られた化合物VI-aである、上記(27)の製造法。

(35) 化合物(VIII-b)が、化合物(VIII-a)よりラク톤を形成させて得られた化合物(VIII-b)である、上記(28)の製造法。

(36) 化合物(VIII-a)が、化合物(VIII-b)のラク톤を開環させて得られた化合物(VIII-a)である、上記(28)の製造法。

(37) 形質転換体の培養物の処理物が、培養菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩砕物、該菌体の溶媒処理物等の菌体処理物、菌体の蛋白分画物、菌体および菌体処理物の固定化物から選ばれる処理物である、上記(25)～(28)いずれかに記載の製造法。

(38) 上記(22)～(24)のいずれか1つに記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に上記(1)～(12)のいずれか1つに記載の蛋白質を生成、蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することの特徴とする、該蛋白質の製造法。

(39) 配列番号2、41、43および44記載の塩基配列からな

る群より選ばれる塩基配列中の連続した5～60塩基からなる配列に相当するオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチドと相補的な配列に相当するオリゴヌクレオチド。

以下、本願発明を詳細に説明する。

#### I. yjiB遺伝子の取得

既に決定されている枯草菌の染色体の塩基配列情報

[<http://www.pasteur.fr/Bio/Subtilist.html>]および該塩基配列より推定された枯草菌yjiB遺伝子情報を利用し、本願発明のDNAをPCR法〔Science, 230, 1350(1985)〕によりクローニングし、取得することができる。

具体的には以下の方法により取得することができる。

枯草菌、例えばB. subtilis ATCC15563株を枯草菌に適した培地、例えばLB液体培地〔バクトトリプトン(ディフコ社製) 10g、酵母エキス(ディフコ社製) 5g、NaCl 5gを水1リットルに含みpH7.2に調整した培地〕を用い、常法に従って培養する。培養後、培養物より遠心分離により菌体を取得する。

取得した菌体より公知の方法(例えば、モレキュラー・クローニング第二版)に従い染色体DNAを単離する。

配列番号2に記載された塩基配列情報を利用し、本願発明の蛋白質をコードするDNA領域に対応する塩基配列を含有するセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーをDNA合成機を用いて合成する。

PCR法により増幅後、該増幅DNA断片をプラスミドに導入可能とするために、センスプライマーおよびアンチセンスプライマーの5'末端には適切な制限酵素サイト、例えばBamHI、EcoRI等の制限酵素サイトを付加させることが好ましい。

該センスプライマー、アンチセンスプライマーの組合せとしては、例えば、配列番号13および14の組合せの塩基配列を有するDNA等をあ

げることができる。

染色体DNAを鋳型として、これらプライマー、TaKaRa LA-PCR TM Kit Ver.2(宝酒造社製)またはExpand TM High-Fidelity PCR System(ベリンガー・マンハイム社製)等を用い、DNA Thermal Cycler(パーキンエルマージャパン社製)でPCRを行う。

PCRを行う場合は、例えば以下のような方法を用いることができる。即ち、上記プライマーが2kb以下のDNA断片の場合には94℃で30秒間、55℃で30秒～1分間、72℃で2分間からなる反応工程を1サイクルとする。上記プライマーが2kbを超えるDNA断片の場合には98℃で20秒間、68℃で3分間からなる反応工程を1サイクルとする。いずれの場合も30サイクル行った後、72℃で7分間反応させる条件下で行う。

増幅されたDNA断片を、上記プライマーで付与した制限酵素サイトと同じサイトで切断後、アガロース電気泳動、シュークロース密度勾配超遠心分離等の手法により該DNA断片を分画・回収する。

該回収DNA断片を用い、常法、例えば、モレキュラー・クローニング 第二版、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1 ~38, John Wiley & Sons (1987-1997)(以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプリメントと略す)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばSuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning(ライフ・テクノロジーズ社製)やZAP-cDNA Synthesis Kit〔ストラタジーン(Staratagene)社製〕を用いクローニングベクターを作製し、作製したクローニングベクターを用い、大腸菌、例えばE. coli DH5α株(東洋紡より購入可能)を形質転換する。

該大腸菌を形質転換するためのクローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自律複製できるものであれば、ファージベクター、プラス

ミドベクター等いずれでも使用できる、大腸菌の発現用ベクターをクローニングベクターとして用いてもよい。具体的には、ZAP Express〔ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)〕、pBluescript II SK(+)[Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、Lambda ZAP II (ストラタジーン社製)、 $\lambda$ gt10、 $\lambda$ gt11〔DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)〕、 $\lambda$ TriplEx (クローンテック社製)、 $\lambda$ ExCell (ファルマシア社製)、pT7T318U (ファルマシア社製)、pcD2〔H.Okayama and P.Berg; Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)〕、pMW218 (和光純薬社製)、pUC118、pSTV28 (宝酒造社製)、pEG400〔J. Bac., 172, 2392 (1990)〕、pHMV1520 (MoBiTec社製)、pQE-30 (QIAGEN社製)等をあげることができる。

得られた形質転換株より、目的とするDNAを含有したプラスミドを常法、例えば、モレキュラー・クローニング 第二版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプリメント、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等に記載された方法により取得することができる。

該方法により、化合物(I-a)または化合物(I-b)から化合物(II-a)または化合物(II-b)を生成する反応を触媒する蛋白質をコードするDNAを含むプラスミドを取得することができる。

該プラスミドとして、例えば、後述するpSyjiBをあげることができる。

上記の方法とは別に、適当なベクターを用いて大腸菌を宿主として枯草菌の染色体ライブラリーを作成し、このライブラリーの各株について化合物(I-a)または化合物(I-b)から化合物(II-a)または化合物(II-b)を生成する活性を調べる方法でも、化合物(I-a)または化合物(I-b)から化合物(II-a)または化合物(II-b)を生成する反応を触媒する蛋白質をコードするDNAを含むプラスミドを取得することができる。

上記により得られた遺伝子の塩基配列などを利用して他の原核生物あるいは植物から該DNAのホモログを上記と同様の方法により取得することができる。

上述の方法で取得した本発明のDNAおよびDNA断片を用い、常法により本発明のDNAの一部の配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチド、センス・オリゴヌクレオチド等のオリゴヌクレオチド、あるいはRNAを含むオリゴヌクレオチドを調製することができる。また、上記で得られたDNA配列情報をもとに、上記のDNA合成機を用いて、これらオリゴヌクレオチドを合成することができる。

該オリゴヌクレオチドとしては、上記DNAの有する塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができる。またこれらDNAと相補的な配列を有するRNAも本発明のオリゴヌクレオチドである。

該オリゴヌクレオチドとして、例えば、配列番号2、41、43または44で表される塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができる。センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用いる場合には、両者の融解温度( $T_m$ )および塩基数が極端に変わることのない上記記載のオリゴヌクレオチドが好ましい。具体的には、配列番号3～39に示された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをあげることができる。

更に、これらオリゴヌクレオチドの誘導体（以下、オリゴヌクレオチド誘導体という）も本発明のオリゴヌクレオチドとして利用することができる。

オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'



-P5' ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等をあげることができる〔細胞工学, 16, 1463 (1997)〕。

II. 化合物 (I-a) または化合物 (I-b) から化合物 (II-a) または化合物 (II-b) を生成する反応を触媒する蛋白質の製造法

上記のようにして得られたDNAを宿主細胞中で発現させるためには、まず、目的とする該DNA断片を、制限酵素類あるいはDNA分解酵素類で、該遺伝子を含む適当な長さのDNA断片とした後に、発現ベクター中プロモーターの下流に挿入し、次いで該発現ベクターを、発現ベクターの使用に適した宿主細胞中に導入する。

宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものは全て用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込みが可能で、上記目的とするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、上記DNAを発現させるための発現ベクターは該細胞中で自立複製可能であると同時に、

プロモーター、リボソーム結合配列、上記DNAおよび転写終結配列より構成された組換えベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもベーリンガーマンハイム社より市販）、pKK233-2（Pharmacia社製）、pSE280（Invitrogen社製）、pGEMEX-1（Promega社製）、pQE-8（QIAGEN社製）、pQE-30（QIAGEN社製）、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP200〔Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)〕、pLSA1〔Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)〕、pGEL1〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)〕、pBluescriptII SK(+), pBluescriptII SK(-) (Stratagene社製)、pTrS30(FERMBP-5407)、pTrS32(FERM BP-5408)、pGEX (Pharmacia社製)、pET-3 (Novagen社製)、pTerm2(US4686191、US4939094、US5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pUC18〔gene, 33, 103 (1985)〕、pUC19〔Gene, 33, 103 (1985)〕、pSTV28(宝酒造社製)、pSTV29(宝酒造社製)、pUC118(宝酒造社製)、pPA1(特開昭63-233798)、pEG400〔J. Bacteriol., 172, 2392(1990)〕、pQE-30 (QIAGEN社製)、PHY300(宝酒造社製)、pHW1520 (MoBiTec社製)等を例示することができる。

プロモーターとしては、宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター (P trp)、lacプロモーター (P lac)、PLプロモーター、PRプロモーター、PSEプロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。またP trpを2つ直列させたプロモーター (P trp x 2)、tacプロモーター、letIプロモーター、lacT7プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。さらにBacillus属細菌中で発現させるためのxylAプロモーターやCorynebacterium属細菌中で発現させる

ためのP54-6プロモーターなども用いることができる。

リボソーム結合配列としては、宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよいが、シャインーダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6~18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

転写・翻訳を効率的に行なうため、化合物 (I-a) または化合物 (I-b) から化合物 (II-a) または化合物 (II-b) を生成する反応を触媒する蛋白質のN末端またはその一部を欠失した蛋白質と発現ベクターのコードする蛋白質のN末端部分を融合させた蛋白質を発現させてもよい。このような例として例えば後述するpWyjiBがあげられる。

目的とするDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子直下に転写終結配列を配置することが望ましい。

原核生物としては、Escherichia属、Corynebacterium属、Brevibacterium属、Bacillus属、Microbacterium属、Serratia属、Pseudomonas属、Agrobacterium属、Alicyclobacillus属、Anabaena属、Anacystis属、Arthrobacter属、Azotobacter属、Chromatium属、Erwinia属、Methylobacterium属、Phormidium属、Rhodobacter属、Rhodopseudomonas属、Rhodospirillum属、Streptomyces属、Synechococcus属、Zymomonas属等に属する微生物をあげることができ、好ましくは、Escherichia属、Corynebacterium属、Brevibacterium属、Bacillus属、Pseudomonas属、Agrobacterium属、Alicyclobacillus属、Anabaena属、Anacystis属、Arthrobacter属、Azotobacter属、Chromatium属、Erwinia属、Methylobacterium属、Phormidium属、Rhodobacter属、Rhodopseudomonas属、Rhodospirillum属、Streptomyces属、Synechococcus属、Zymomonas属に属する微生物等をあげることができる。

該微生物の具体例として、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli

DH5 $\alpha$ , Escherichia coli MC1000, Escherichia coli KY3276, Escherichia coli W1485, Escherichia coli JM109, Escherichia coli HB101, Escherichia coli No.49, Escherichia coli W3110, Escherichia coli NY49, Escherichia coli MP347, Escherichia coli NM522, Bacillus subtilis ATCC33712, Bacillus megaterium, Bacillus sp. FERM BP-6030, Bacillus amyloliquefacines, Brevibacterium ammoniagenes, Brevibacterium immariophilum ATCC14068, Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066, Brevibacterium flavum ATCC14067, Brevibacterium lactofermentum ATCC13869, Corynebacterium glutamicum ATCC13032, Corynebacterium glutamicum ATCC14297, Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870, Corynebacterium callunae ATCC15991, Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354, Serratia ficaria, Serratia fonticola, Serratia liquefaciens, Serratia marcescens, Pseudomonas sp. D-0110, Agrobacterium radiobacter, Agrobacterium rhizogenes, Agrobacterium rubi, Anabaena cylindrica, Anabaena doliolum, Anabaena flos-aquae, Arthrobacter aurescens, Arthrobacter citreus, Arthrobacter globiformis, Arthrobacter hydrocarboglutamicus, Arthrobacter mysorens, Arthrobacter nicotianae, Arthrobacter paraffineus, Arthrobacter protophormiae, Arthrobacter roseoparaffinus, Arthrobacter sulfureus, Arthrobacter ureafaciens, Chromatium buderii, Chromatium tepidum, Chromatium vinosum, Chromatium warmingii, Chromatium fluviatile, Erwinia uredovora, Erwinia carotovora, Erwinia ananas, Erwinia herbicola, Erwinia punctata, Erwinia terreus, Methylobacterium rhodesianum, Methylobacterium extorquens, Phormidium sp. ATCC29409, Rhodobacter capsulatus, Rhodobacter sphaeroides, Rhodopseudomonas blastica, Rhodopseudomonas marina,

Rhodopseudomonas palustris、Rhodospirillum rubrum、Rhodospirillum salexigens、Rhodospirillum salinarum、Streptomyces ambofaciens、Streptomyces aureofaciens、Streptomyces aureus、Streptomyces fungicidicus、Streptomyces griseochromogenes、Streptomyces griseus、Streptomyces lividans、Streptomyces olivogriseus、Streptomyces rameus、Streptomyces tanashiensis、Streptomyces vinaceus、Zymomonas mobilis等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができる。例えば、カルシウムイオンを用いる方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)〕、プロトプラスト法（特開昭63-248394）、エレクトロポレーション法またはGene, 17, 107 (1982)やMolecular & General Genetics, 168, 111 (1979)に記載の方法等をあげることができる。

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEp13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等を例示することができる。

プロモーターとしては、酵母中で発現できるものであればいかなるものでもよく、例えば、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF $\alpha$ 1プロモーター、CUP1プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

酵母菌株としては、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)〕、スフェロプラスト法〔Proc.

Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978))、酢酸リチウム法〔J. Bacteriol., 153, 163(1983)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978))〕記載の方法等をあげることができる。

動物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、p c D N A I、pcDM8 (フナコシ社より市販)、pAGE107〔特開平3-22979; Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、pAS3-3 (特開平2-227075)、pCDM8〔Nature, 329, 840 (1987)〕、pcDNAI/Amp (Invitrogen社製)、pREP4 (Invitrogen社製)、pAGE103〔J. Biochem., 101, 1307 (1987)〕、pAGE210等をあげることができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (ヒトCMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR $\alpha$ プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

動物細胞としては、ナマルバ細胞、HBT5637 (特開昭63-299)、COS1細胞、COS7細胞、CHO細胞等をあげることができる。

動物細胞への組換えベクターの導入法としては、動物細胞にDNAを導入できるいかなる方法も用いることができる。例えば、エレクトロポレーション法〔Cytotechnology, 3, 133(1990)〕、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413(1987)、Virology, 52, 456 (1973)〕に記載の方法等があげられる。形質転換体の取得および培養は、特開平2-227075号公報あるいは特開平2-257891号公報に記載されている方法に準じて行なうことができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばバキュロウイルス・イ

クスプレッション・ベクターズ・ア・ラボラトリー・マニュアル

(Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サブルメント1-38(1987-1997)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにインビトロジェン社製) 等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞であるSf9、Sf21〔バキュロウイルス・エクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー (W. H. Freeman and Company)、ニューヨーク (New York)、(1992)〕、Trichoplusia niの卵巣細胞であるHigh 5 (インビトロジェン社製) 等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法(特開平2-227075)、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕等をあげることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング 第二版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白

質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加された蛋白質を得ることができる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に化合物(I-a)または化合物(I-b)から化合物(II-a)または化合物(II-b)を生成する反応を触媒する蛋白質を生成、蓄積させ、該培養物より該蛋白質を採取することにより、化合物(I-a)または化合物(I-b)から化合物(II-a)または化合物(II-b)を生成する反応を触媒する蛋白質を製造することができる。

本願発明の、化合物(I-a)または化合物(I-b)から化合物(II-a)または化合物(II-b)を生成する反応を触媒する蛋白質製造用の形質転換体を培地に培養する方法は、形質転換体の宿主の培養に用いられる通常の方法を用いることができる。

本願発明の形質転換体が大腸菌等の原核生物、酵母菌等の真核生物である場合、これら微生物を培養する培地は、該微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

炭素源としては、それぞれの微生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類が用いられる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、等の各種無機酸や有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等が用いられる。

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸



マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15～50℃がよく、培養時間は、通常16時間～7日間である。培養中pHは、3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸 (IAA) 等を、xylAプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する時にはキシロースを、それぞれ培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地〔The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)〕、EagleのMEM培地〔Science, 122, 501 (1952)〕、DMEM培地〔Virology, 8, 396 (1959)〕、199培地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1(1950)〕またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

培養は、通常pH6～8、30～40℃、5%CO<sub>2</sub>存在下等の条件下で1～7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地〔Pharmingen社製〕、Sf-900 II SFM培地（ギブコBRL社製）、ExCell400、ExCell405〔いずれもJRH Biosciences社製〕、Grace's Insect Medium〔Grace, T.C.C., Nature, 195, 788 (1962)〕等を用いることができる。

培養は、通常pH6～7、25～30℃等の条件下で、1～5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

化合物（I-a）または化合物（I-b）から化合物（II-a）または化合物（II-b）を生成する反応を触媒する蛋白質を本願発明の形質転換体の培養物から単離精製するには、通常の酵素の単離、精製法を用いればよい。

例えば、本願発明の蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル（DEAE）セファロース、DIAION HPA-75（三菱化成社製）等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF（ファルマシア社製）等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

また、該蛋白質が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該蛋白質を回収する。回収された該蛋白質の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を、蛋白質変性剤を含まないあるいは蛋白質変性剤の濃度が蛋白質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該蛋白質を正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

本願発明の蛋白質あるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清から該蛋白質あるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

このようにして取得される蛋白質として、例えば、配列番号 1、42 または 45 に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をあげることができる。また、上記方法により発現させた蛋白質を、Fmoc法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法によっても製造することができる。また、該蛋白質は桑和貿易(米国Advanced chemTech社製)、パーキンエルマージャパン(米国Perkin-Elmer社製)、ファルマシアバイオテク(スウェーデンPharmacia Biotech社製)、アロカ(米国Protein Technology Instrument社製)、クラボウ(米国Synthecell-Vega社製)、日本パーセプティブ・リミテッド(米国PerSeptive社製)、島津製作所等のペプチド合成機を利用して合成することによっても得ることができる。

### III. 化合物(II-a)または化合物(II-b)の製造

上記II. で取得された形質転換体を上記II. の方法に準じて培養して得られる細胞、該細胞の培養物、該培養物の処理物、または該細胞から

抽出した酵素などを酵素源として用い、化合物(I-a)または化合物(I-b)を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に化合物(II-a)または化合物(II-b)を生成、蓄積させ、該水性媒体中から化合物(II-a)または化合物(II-b)を採取することにより、化合物(II-a)または化合物(II-b)を製造することができる。

細胞の培養物の処理物としては、該細胞の乾燥物、該細胞の凍結乾燥物、該細胞の界面活性剤処理物、該細胞の酵素処理物、該細胞の超音波破碎物、該細胞の機械的摩砕物、該細胞の溶媒処理物などの細胞処理物、該細胞の蛋白質分画物、該細胞および該細胞処理物の固定化物等があげられる。

化合物(I-a)または化合物(I-b)から化合物(II-a)または化合物(II-b)への変換方法は、(a)細胞を培養する培地にあらかじめ化合物(I-a)または化合物(I-b)を添加する方法、(b)培養中に化合物(I-a)または化合物(I-b)を添加する方法のいずれの方法でも用いることができる。また、細胞を培養して得られた酵素源を、化合物(I-a)または化合物(I-b)に水性媒体中で作用させる方法を用いてもよい。

化合物(I-a)または化合物(I-b)を細胞を培養する培地中に添加する場合、化合物(I-a)または化合物(I-b)は培地1mlあたり0.1~10mg、好ましくは0.2~1mgを培養の初発または培養の途中に添加する。化合物(I-a)または化合物(I-b)は水またはメチルアルコール、エチルアルコール等の有機溶媒に溶解した後培地に添加することが望ましい。

細胞を培養して得られた酵素源を、化合物(I-a)または化合物(I-b)に水性媒体中で作用させる方法を用いる場合、用いる酵素源の量は、当該酵素源の比活性等により異なる。例えば、酵素源として細胞の培養物もしくは細胞またはそれらの処理物を用いる場合は、該酵素源を化合物(I-a)または化合物(I-b)1mgあたり5~1000mg、好ましくは10~400mg添加する。反応は水性媒体中20~50℃で行なうことが好ましく、

特に25℃～37℃で行なうことが好ましい。反応時間は用いる酵素源の量および比活性等により異なるが、通常2～150時間、好ましくは6～120時間である。

水性媒体としては、水、リン酸緩衝液、HEPES(N-2ヒドロキシエチルピペラジン-N-エタンスルホン酸)緩衝液、トリス[トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン]塩酸緩衝液等の緩衝液があげられる。反応を阻害しなければ該緩衝液に有機溶媒を添加してもよい。有機溶媒としては、アセトン、酢酸エチル、ジメチルスルホキシド、キシレン、メチルアルコール、エチルアルコール、ブタノール等があげられる。有機溶媒と水性媒体との混合液は、例えば化合物(I-b)を用いる場合好ましく用いられる。

化合物(I-a)または化合物(I-b)を水性媒体に添加する場合、化合物(I-a)または化合物(I-b)を溶解することのできる水性媒体に化合物(I-a)または化合物(I-b)を溶解し、水性媒体に添加する。反応を阻害しなければ、溶解する該水性媒体に有機溶媒を添加してもよい。有機溶媒としては、アセトン、酢酸エチル、ジメチルスルホキシド、キシレン、メチルアルコール、エチルアルコール、ブタノール等があげられる。

化合物(I-b)および化合物(II-b)は下記に例示するラクトンの開環方法により、容易に化合物(I-a)および化合物(II-a)にそれぞれ変換することができる。また、化合物(I-a)および化合物(II-a)は下記に例示するラクトンの生成方法により、容易に化合物(I-b)および化合物(II-b)にそれぞれ変換することができる。

ラクトンの開環方法としては、化合物(I-b)または化合物(II-b)を水性媒体に溶解し、酸またはアルカリを添加する方法があげられる。水性媒体としては、例えば水、リン酸緩衝液、トリス緩衝液等反応を阻害しない塩類を含む水溶液があげられる。該水溶液中には、反応を阻害

しない程度の濃度のメタノール、エタノール、酢酸エチル等の有機溶媒を含んでいてもよい。酸としては酢酸、塩酸、硫酸等の酸が挙げられ、アルカリとしては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア等があげられる。

ラクトンの生成方法としては、化合物(I-a)または化合物(II-a)を非水系の溶媒に溶解し、酸または塩基触媒を添加する方法があげられる。非水系の溶媒としては実質的に水を含まない有機溶媒で化合物(I-a)または化合物(II-a)を溶解できるものならばいかなるものでも用いることができる。非水系の溶媒としては、例えば、ジクロロメタン、酢酸エチル等があげられる。触媒としては、ラクトン化反応を触媒し、基質や反応産物にラクトン化以外の作用を及ぼさないものならば、どのようなものでも用いることができる。該触媒としては、例えば、トリフルオロ酢酸やパラトルエンスルホン酸等があげられる。反応温度は特に制限はないが、0~100°Cが好ましく、20~80°Cが特に好ましい。

反応溶液からの化合物(II-a)または化合物(II-b)の採取は、通常の有機合成化学で用いられる方法、例えば、有機溶媒による抽出、結晶化、薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等により行うことができる。

本願発明により得られる化合物(II-a)または化合物(II-b)の確認または定量方法は、化合物(II-a)および/または化合物(II-b)を確認または定量できる方法であれば、いずれの方法でも用いることができる。例えば、<sup>13</sup>C-NMRスペクトル、<sup>1</sup>H-NMRスペクトル、マススペクトル、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等の方法があげられる。

本発明において、化合物(I-a)、化合物(I-b)、化合物(II-a)および化合物(II-b)の中には、光学異性体等の立体異性体が存在し得るものもあるが、本発明は、これらを含め、全ての可能な異性体およびそれらの混合物を包含する。

化合物(I-a)としては、化合物(III-a)が好ましく、化合物(V-a)がより好ましく、化合物(VII-a)が特に好ましい。

化合物(I-b)としては、化合物(III-b)が好ましく、化合物(V-b)がより好ましく化合物(VII-b)が特に好ましい。

化合物(II-a)としては、化合物(IV-a)が好ましく、化合物(VI-a)がより好ましく、化合物(VIII-a)が特に好ましい。

化合物(II-b)としては、化合物(IV-b)が好ましく、化合物(VI-b)がより好ましく、化合物(VIII-b)が特に好ましい。

アルキルとしては、直鎖または分岐状の、炭素数1~10、好ましくは1~6のアルキルであり、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、イソヘキシル、ヘプチル、4,4-ジメチルペンチル、オクチル、2,2,4-トリメチルペンチル、ノニル、デシル、これら各種分岐鎖異性体等があげられる。

アリールとしては、フェニル、ナフチル等があげられる。

置換アルキルにおける置換基としては、同一または異なって1~3のハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、アルコキシ、アリール等があげられる。

置換アリールにおける置換基としては、同一または異なって1~3のハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、アルキル、アルコキシ等があげられる。

アルコキシにおけるアルキル部分は上述のアルキルと同義である。

アルカリ金属とは、リチウム、ナトリウム、カリウム、ルビジウム、セシウム、フランシウムの各元素を表す。

以下に本願発明の実施例を示すが、本願発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### 発明を実施するための最良の形態

実施例1 化合物(VII-a)または化合物(VII-b)から化合物(VIII

-a) または化合物 (VIII-b) を生成する活性を有する蛋白質をコードする DNA の取得

化合物 (VII-b) (シグマ社製) 100mg を 9.5ml のメタノールに溶解した後、1 mol/l 水酸化ナトリウム 0.5ml を加えて室温で 1 時間振盪した。得られた溶液を乾固し脱イオン水 5ml を加えて溶解し 1 mol/l 塩酸約 0.1ml で pH を約 7 に調整し、さらに脱イオン水 4.9ml を加えることにより最終濃度が 10mg/ml の化合物 (VII-a) [式中 R がナトリウムである化合物] を 10ml 得た。

Bacillus subtilis Marburg 168 株 (ATCC 15563 株) を 1 白金耳、10ml の LB 液体培地に植菌し、30°C で一晩培養した。培養後、得られた培養液より遠心分離により菌体を取得した。

該菌体より、常法に従い染色体 DNA を単離・精製した。

配列番号 3 および 4、配列番号 5 および 6、配列番号 7 および 8、配列番号 9 および 10、配列番号 11 および 12、配列番号 13 および 14、配列番号 15 および 16 の塩基配列の組合せを有するセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーを DNA 合成機を用いて合成した。

染色体 DNA を鋳型として、これらプライマーと、TaKaRa LA-PCR TM Kit Ver.2 (宝酒造社製)、Expand TM High-Fidelity PCR System (ベーリンガー・マンハイム社製) または Taq DNA polymerase (Boehringer 社製) を用い、DNA Thermal Cycler (パーキンエルマー・ジャパン社製) で PCR を行った。

PCR は、2kb 以下の DNA 断片は 94°C で 30 秒間、55°C で 30 秒、72°C で 2 分間からなる反応工程を 1 サイクルとして、2kb を超える DNA 断片は 98°C で 20 秒間、68°C で 3 分間からなる反応工程を 1 サイクルとして、30 サイクル行った後、72°C で 7 分間反応させる条件下で行った。

PCR により増幅された DNA 断片のうち、配列番号 3 と 4 のプライマーの組み合わせで増幅された DNA 断片 (bioI 遺伝子含有) は制限酵



素EcoRIと制限酵素SalIで、配列番号5と6のプライマーの組み合わせで増幅されたDNA断片(cypA遺伝子含有)は制限酵素XbaIと制限酵素SmaIで、配列番号7と8のプライマーの組み合わせで増幅されたDNA断片(cypX遺伝子含有)は制限酵素SmaIと制限酵素SalIで、配列番号9と10のプライマーの組み合わせで増幅されたDNA断片(pksS遺伝子含有)は制限酵素EcoRIと制限酵素SalIで、配列番号11と12のプライマーの組み合わせで増幅されたDNA断片(yet0遺伝子含有)は制限酵素XbaIと制限酵素BglIIで、配列番号13と14のプライマーの組み合わせで増幅されたDNA断片(yjiB遺伝子含有)は制限酵素XbaIと制限酵素SmaIで、配列番号15と16(yrhJ遺伝子含有)のプライマーの組み合わせで増幅されたDNA断片は制限酵素XbaIと制限酵素SmaIでそれぞれ消化した。

消化後、これら制限酵素処理DNA断片をアガロースゲル電気泳動し、各制限酵素処理DNA断片を取得した。

ベクタープラスミドpUC119(宝酒造社製)を、制限酵素SalIおよびEcoRIで消化後、アガロースゲル電気泳動を行い、SalI-EcoRI処理pUC119断片を取得した。同様にベクタープラスミドpUC119を、制限酵素SalIおよびSmaIで消化後、アガロースゲル電気泳動を行い、SalI-SmaI処理pUC119断片を取得した。

pSTV28(宝酒造社製)を制限酵素XbaIおよびSmaIで消化後、アガロースゲル電気泳動を行い、XbaI-SmaI処理pSTV28断片を取得した。同様にベクタープラスミドpSTV28を、制限酵素XbaIおよびBamHIで消化後、アガロースゲル電気泳動を行い、XbaI-BamHI処理pSTV28断片を取得した。

上記で取得されたEcoRI-SalI処理DNA断片(配列番号3と4のプライマーの組みあわせでPCR増幅)はSalI-EcoRI処理pUC119断片と、XbaI-SmaI処理DNA断片(配列番号5と6のプライマーの組みあわせでPCR増幅)はXbaI-SmaI処理pSTV28断片と、SmaI-SalI処理DNA断

片（配列番号7と8のプライマーの組みあわせでPCR増幅）はSalI-SmaI処理pUC119断片と、EcoRI-SalI処理DNA断片（配列番号9と10のプライマーの組みあわせでPCR増幅）はSalI-EcoRI処理pUC119断片と、XbaI-BglII処理DNA断片（配列番号11と12のプライマーの組みあわせでPCR増幅）はXbaI-BamHI処理pSTV28断片と、XbaI-SmaI処理DNA断片（配列番号13と14のプライマーの組みあわせでPCR増幅）はXbaI-SmaI処理pSTV28断片と、XbaI-SmaI処理DNA断片（配列番号15と16のプライマーの組みあわせでPCR増幅）はXbaI-SmaI処理pSTV28断片とそれぞれ混合した後、エタノール沈殿を行い、得られたDNA沈殿物を5 $\mu$ lの蒸留水に溶解し、ライゲーション反応を行うことにより組換え体DNAを各々取得した。

該組換え体DNAを用い、*E. coli*（東洋紡より購入）DH5 $\alpha$ 株を常法に従って形質転換後、該形質転換体を、pUC119をベクタープラスミドとして用いる場合はアンピシリン100 $\mu$ g/mlを含むLB寒天[1L中にバクトトリプトン（ディフコ社製）10g、バクトイーストエキストラクト（ディフコ社製）5g、NaCl5gを含み1mol/l NaOHにてpH7.4に調整、寒天を1.5%になるように添加]培地に、pSTV28をベクタープラスミドとして用いる場合はクロラムフェニコール25 $\mu$ g/mlを含むLB寒天培地にそれぞれ塗布し、25 $^{\circ}$ Cで2日間培養した。

生育してきたアンピシリン耐性またはクロラムフェニコール耐性の形質転換体のコロニーを数個選択し、アンピシリン100 $\mu$ g/mlまたはクロラムフェニコール25 $\mu$ g/mlを含むLB液体培地[1L中にバクトトリプトン（ディフコ社製）10g、バクトイーストエキストラクト（ディフコ社製）5g、NaCl 5gを含み、1mol/l NaOHにてpH7.4に調整]10mlに植菌した後に、25 $^{\circ}$ Cで2日間振盪培養した。

得られた培養液を遠心分離することにより菌体を取得した。

該菌体より常法に従ってプラスミドを単離した。

単離したプラスミドを各種制限酵素で切断して構造を調べ、塩基配列を決定した結果、該プラスミド中には目的のDNA断片が挿入されていることが確認された。EcoRI-SalI処理DNA断片(配列番号3と4のプライマーの組みあわせでPCR増幅)とSalI-EcoRI処理pUC119断片を連結して得られたプラスミドをpUbiol、XbaI-SmaI処理DNA断片(配列番号5と6のプライマーの組みあわせでPCR増幅)とXbaI-SmaI処理pSTV28断片を連結して得られたプラスミドをpScypA、SmaI-SalI処理DNA断片(配列番号7と8のプライマーの組みあわせでPCR増幅)とSalI-SmaI処理pUC119断片を連結して得られたプラスミドをpUcypX、EcoRI-SalI処理DNA断片(配列番号9と10のプライマーの組みあわせでPCR増幅)とSalI-EcoRI処理pUC119断片を連結して得られたプラスミドをpUpksS、XbaI-BglII処理DNA断片(配列番号11と12のプライマーの組みあわせでPCR増幅)とXbaI-BamHI処理pSTV28断片を連結して得られたプラスミドをpSyet0、XbaI-SmaI処理DNA断片(配列番号13と14のプライマーの組みあわせでPCR増幅)とXbaI-SmaI処理pSTV28断片を連結して得られたプラスミドをpSyjiB、XbaI-SmaI処理DNA断片(配列番号15と16のプライマーの組みあわせでPCR増幅)とXbaI-SmaI処理pSTV28断片を連結して得られたプラスミドをpSyrhJとそれぞれ命名した。

こうして得られたプラスミドを含有する大腸菌DH5 $\alpha$ 、pUC119またはpSTV28を含有する大腸菌DH5 $\alpha$ およびプラスミドを持たない大腸菌DH5 $\alpha$ をそれぞれLB液体培地3ml(ベクタープラスミドの有する薬剤耐性遺伝子に対応する薬剤を添加)に植菌し28°Cで12時間振とう培養した。この培養液0.5mlをグルコース1%、CaCO<sub>3</sub>1%を含むLB液体培地(薬剤耐性遺伝子に対応する薬剤を添加)に植菌し28°Cで12時間振とう培養した。この培養液1mlをアシストチューブ(アシスト社製)に入れ、グルコースと先に得た化合物(VII-a)(R<sup>1</sup>がナトリウムの化合物)をそれぞ

れ終濃度 1 % および 100mg/l になるように添加し、28℃で24時間振とうした。反応終了後、遠心分離によって菌体を除去し、得られた反応上清に等量の酢酸エチルを加えてよく振とうした。該溶液から遠心分離によって上層の酢酸エチル層を分離し、該酢酸エチル層を遠心エバポレーターにて乾固した。該乾枯物を最初の培養上清の1/5量のメタノールに溶解し、HPLC分析[カラム ; Inertsil ODS-2(5 $\mu$ m, 4x250mm, ジーエルサイエンス社製)、カラム温度 ; 60℃、移動相 ; アセトニトリル : 水 : リン酸 = 55 : 45 : 0.05、流速 : 0.9ml/分、検出波長 : 237nm]を行ない、化合物 (VIII-a) (式中 R<sup>1</sup> はナトリウムである化合物) の検出、定量を行なった。結果を表 1 に示す。

表 1

プラスミド	化合物 (VIII-a) (mg/l)
なし	0
pUC119	0
pSTV28	0
pUbioI	0
pScypA	0
pUcypX	0
pUpksS	0
pSyetO	0
pSyjiB	0.6
pSyrhJ	0

実施例 2 枯草菌を宿主とする yjiB 遺伝子の発現および該遺伝子によりコードされる蛋白質の活性の確認

配列番号 17 および 18、配列番号 19 および 20、配列番号 21 および 22、配列番号 23 および 24、配列番号 25 および 26、配列番

号27および28、配列番号29および30の塩基配列の組合せを有するセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーをDNA合成機を用いて合成した。

実施例1で取得した枯草菌染色体DNAを鋳型として、これらプライマーと、TaKaRa LA-PCR TM Kit Ver.2(宝酒造社製)、Expand TM High-Fidelity PCR System(ベーリンガー・マンハイム社製)またはTaq DNA polymerase (Boelinger社製)を用い、DNA Thermal Cycler(パーキンエルマージャパン社製)でPCRを行った。

PCRは、2kb以下のDNA断片は94℃で30秒間、55℃で30秒、72℃で2分間からなる反応工程を1サイクルとして、2kbを超えるDNA断片は98℃で20秒間、68℃で3分間からなる反応工程を1サイクルとして、30サイクル行った後、72℃で7分間反応させる条件で行った。

PCRにより増幅されたDNA断片のうち、配列番号17と18のプライマーの組み合わせで増幅されたDNA断片(bioI遺伝子含有)は制限酵素SpeIと制限酵素BamHIで、配列番号19と20のプライマーの組み合わせで増幅されたDNA断片(cypA遺伝子含有)は制限酵素SpeIと制限酵素BamHIで、配列番号21と22のプライマーの組み合わせで増幅されたDNA断片(cypX遺伝子含有)は制限酵素SpeIと制限酵素NruIで、配列番号23と24のプライマーの組み合わせで増幅されたDNA断片(pksS遺伝子含有)は制限酵素SpeIと制限酵素BamHIで、配列番号25と26のプライマーの組み合わせで増幅されたDNA断片(yet0遺伝子含有)は制限酵素SpeIと制限酵素BamHIで、配列番号27と28のプライマーの組み合わせで増幅されたDNA断片(yjiB遺伝子含有)は制限酵素SpeIと制限酵素BamHIで、配列番号29と30(yrhJ遺伝子含有)のプライマーの組み合わせで増幅されたDNA断片は制限酵素SpeIと制限酵素BamHIでそれぞれ消化した。

消化後、これら制限酵素処理DNA断片をアガロースゲル電気泳動し、

各制限酵素処理DNA断片を取得した。

ベクタープラスミドpWH1520 (MoBiTec社製) を、制限酵素SpeIおよびBamHIで消化後、アガロースゲル電気泳動を行い、SpeI-BamHI処理pWH1520断片を取得した。同様にベクタープラスミドpWH1520を、制限酵素SpeIおよびNruIで消化後、アガロースゲル電気泳動を行い、SpeI-NruI処理pWH1520断片を取得した。

上記で取得されたSpeI-BamHI処理DNA断片 (配列番号17と18、19と20、23と24、25と26、27と28、および29と30のプライマーの組みあわせでPCR増幅) はSpeI-BamHI処理pWH1520断片と、SpeI-NruI処理DNA断片 (配列番号21と22のプライマーの組みあわせでPCR増幅) はSpeI-NruI処理pWH1520断片と、それぞれ混合した後、エタノール沈殿を行い、得られたDNA沈殿物を5 $\mu$ lの蒸留水に溶解し、ライゲーション反応を行うことにより組換え体DNAを各々取得した。

該組換え体DNAを用い、*E. coli* (東洋紡より購入) DH5 $\alpha$ 株を常法に従って形質転換後、テトラサイクリン10 $\mu$ g/mlを含むLB寒天培地に塗布し、25 $^{\circ}$ Cで2日間培養した。得られた培養液を遠心分離することにより菌体を取得した。

該菌体より常法に従ってプラスミドを単離した。

該方法により単離したプラスミドを各種制限酵素で切断して構造を調べ、塩基配列を決定することにより、該プラスミドは目的のDNA断片が挿入されているプラスミドであることを確認した。配列番号17と18のプライマーの組みあわせでPCR増幅したDNA断片をpWH1520に連結して得られたプラスミドをpWbioI、配列番号19と20のプライマーの組みあわせでPCR増幅したDNA断片をpWH1520に連結して得られたプラスミドをpWcypA、配列番号21と22のプライマーの組みあわせでPCR増幅したDNA断片をpWH1520に連結して得られたプラス

ミドをpWcypX、配列番号23と24のプライマーの組みあわせでPCR増幅したDNA断片をpWH1520に連結して得られたプラスミドをpWpksS、配列番号25と26のプライマーの組みあわせでPCR増幅したDNA断片をpWH1520に連結して得られたプラスミドをpWyet0、配列番号27と28のプライマーの組みあわせでPCR増幅したDNA断片をpWH1520に連結して得られたプラスミドをpWyjiB、配列番号29と30のプライマーの組みあわせでPCR増幅したDNA断片をpWH1520に連結して得られたプラスミドをpWyrhJとそれぞれ命名した。

こうして得られたプラスミドおよびベクタープラスミドpWH1520をS.chang and S.N.cohen[S.chang and S.N.cohen: Mol.Gen.Genet., 168, 111 (1979)]らの方法に従ってBacillus subtilis ATCC33712株に導入した。

即ち、ATCC33712株を5mlのPen培地 (Difco Antibiotic medium No.3 1.75gを水100mlに溶解し、オートクレーブ滅菌したもの)が入った太試験管に植菌し、37℃で一晩振盪培養した。次にPen培地100mlが入った300ml三角フラスコに一晩培養した菌体を全量植菌し、37℃で3時間振盪培養することで対数増殖期中期まで生育させた。該培養液を無菌条件下で5000rpm、10分間遠心分離し、菌体を沈殿させた。上清を除いた後、4.5mlのSMMP[×2 SMMP (ショ糖 34.2g、マレイン酸 0.464g、塩化マグネシウム・6水和物 0.813gを水に溶かし水酸化ナトリウムでpH6.5に調整後、100mlとしてオートクレーブ滅菌したもの)と×4 Pen培地

(Difco Antibiotic medium No.3 7gを水100mlに溶解し、オートクレーブ滅菌したもの)の等量混合物]に懸濁し、リゾチーム溶液[リゾチーム (生化学工業) 10mgを0.5mlのSMMPに溶解させ、ポアサイズ0.45μmのミリポアフィルターでフィルター滅菌したもの]を0.5ml加え、37℃でゆっくりで2時間振盪した。顕微鏡で90%以上の細胞がプロトプラスト化していることを確認した後、3000rpm、20分間遠心分離することで

プロトプラストを沈殿させた。上清を除き、得られたプロトプラストを5mlのSMMPに再懸濁した。再度3000rpm、20分間遠心分離してプロトプラストを集め、SMMP 2mlに懸濁して、形質転換の受容菌のプロトプラスト懸濁液とした。

プラスミドDNA約1 $\mu$ gをSMMPに溶解し、プロトプラスト懸濁液0.5mlとよく混合した。混合してすぐに40%ポリエチレングルコール液[ポリエチレングルコール6000(ナカライテスク)40gを $\times 2$  SMMPに溶かし、水で100mlにした後、オートクレーブ滅菌したもの]1.5mlを加えよく混合した。室温で2分間放置後、5mlのSMMPを加えて混合し、3000rpm、20分間遠心分離した。上清を除いた後、沈殿したプロトプラストに1mlのSMMPを加えて懸濁し、30°Cで3時間ゆっくり振盪した。SMMPで適当に希釈した後、薬剤(テトラサイクリンの場合、10 $\mu$ g/mlになるように加えた)の入ったDM3培地[バクトアガー(ディフコ社製)80g/Lを45ml、カザミノ酸 50g/Lを50ml、コハク酸ナトリウム・6水和物 338g/L pH7.3を250ml、リン酸緩衝液(リン酸水素二カリウム 35g/L、リン酸二水素カリウム 15g/L)を50ml、酵母エキス 100g/Lを25ml、塩化マグネシウム・6水和物 203g/Lを10ml、グルコース 100g/Lを25ml、それぞれオートクレーブ滅菌した後、混合し、0.45 $\mu$ mのミリポアフィルターでフィルター滅菌したウシ血清アルブミン 20mg/mlを3.5ml加えたもの]に塗布した。37°Cで1~2日間培養することで形質転換株を得ることができた。

このようにして上記各プラスミドを有する*B. subtilis* ATCC33712株を取得した。

得られた形質転換体およびプラスミドを導入していないATCC33712株をそれぞれLB液体培地3ml(プラスミド保有株に対してはテトラサイクリン10mg/lを添加)に植菌し30°Cで24時間振とう培養した。この培養液0.25mlをTB培地[バクトトリプトン(ディフコ社製)1.4%、バクトイーストエキストラクト(ディフコ社製)2.4%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.231%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.251%、



1 mol/l水酸化ナトリウムでpH 7.4に調整]5mlを含む試験管に植菌し30℃で3時間振盪培養した。3時間後に培養液1mlをアシストチューブNo.60.540S(アシスト社製)に移し、滅菌した50%キシロース溶液を40 $\mu$ lを添加し、さらに3時間振盪培養した後、実施例1で得た化合物(VII-a)(Rがナトリウムである化合物)を終濃度が0.2 mg/mlになるようにそれぞれの試験管に添加し、さらに16時間30℃で振盪して反応を行なった。

反応終了後、反応液を酢酸でpH3.5に調整した。この反応液0.5mlに酢酸エチル1mlを加え、1時間振盪した。振盪後、3000rpm、5分間の遠心分離によって反応液を2層に分け、上清の酢酸エチル層を回収し、遠心エバポレーターで溶媒を除去した後、残渣をメタノール0.5mlに溶解した。

このメタノール溶液の一部を用いて実施例1と同様にHPLC分析を行ない、化合物(VIII-a)(式中R'はナトリウムである化合物)の検出、定量を行なった。結果を表2に示す。

表2

プラスミド	化合物(VIII-a)(mg/l)
なし	0.5
pWH1520	0.5
pWbioI	0.5
pWcypA	0.5
pWcypX	0.5
pWpksS	0.5
pWyet0	0.5
pWyjiB	24.6
pWyrhJ	0.5

実施例 1、2 の結果より、yjiB 遺伝子に化合物 (VII-a) または化合物 (VII-b) から化合物 (VIII-a) または化合物 (VIII-b) を生成する活性がコードされていることは明らかである。

なお、上記配列番号 27 と 28 のプライマーの組みあわせで PCR 増幅した DNA 断片には、配列番号 2 記載の塩基配列が含まれており、該塩基配列中には、配列番号 1 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする塩基配列が含まれていた。

実施例 3 Bacillus megaterium を宿主とする yjiB 遺伝子の発現および化合物 (VIII-a) の生産

実施例 2 で作成した pWyjiB を実施例 2 に記載した枯草菌の形質転換法と同様の方法で、Bacillus megaterium (MoBiTec 社製) および Bacillus sp. FERM BP-6030 に導入した。

得られた形質転換体およびプラスミドを持たない宿主を、実施例 2 と同様に培養、反応し、生成した化合物 (VIII-a) の量を測定した。結果を表 3 に示す。

表 3

宿主	プラスミド	化合物 (VIII-a) (mg/l)
<u>B. megaterium</u>	なし	2.0
//	pWyjiB	27.2
FERM BP-6030	なし	4.5
//	pWyjiB	30.3

実施例 4 コリネ型細菌で化合物 (VIII-a) を生成する蛋白質を発現させるためのプラスミドの造成

実施例 1 で取得した *yjiB* 遺伝子をコリネ型細菌中で効率よく発現させるため、配列番号 31、32、33、34、35、36、37、38、39 記載の塩基配列を有する DNA を DNA 合成機を用いて合成した。

コリネ型細菌で発現するプロモーター配列 p54-6 (GenBank AJ132582) を含む、配列番号 40 記載の塩基配列を有する DNA 断片を、プラスミドベクター pCS299P (特願平 11-110437) の Sse8387I-BamHI 部位に挿入したプラスミド pRI109 DNA を、このプラスミドで形質転換した *E. coli* NM522 株から常法に従って調製した。

実施例 2 で得られた p*WyjiB* DNA を鋳型とし、配列番号 31 及び 32 の塩基配列を有する DNA プライマーと、Taq DNA polymerase (宝酒造社製) を用い、DNA Thermal Cycler 480 (パーキンエルマージャパン社製) で PCR を行った。

PCR は 96°C で 30 秒間、50°C で 45 秒間、72°C で 3 分間からなる反応工程を 1 サイクルとして 25 サイクル反応させる条件で行った。

PCR により増幅された DNA 断片を SalI と BamHI で消化した後、アガロースゲル電気泳動を行い、約 1.2kb の DNA 断片を常法に従って精製し、SalI-BamHI 処理 DNA 断片を取得した。

上記で得られたプラスミド pRI109 DNA を、制限酵素 SalI と BamHI で消化した後、アガロースゲル電気泳動を行い、約 6kb の DNA 断片を常法に従って精製し、SalI-BamHI 処理 pRI109 断片を取得した。

上記で取得された SalI-BamHI 処理 DNA 断片と SalI-BamHI 処理 pRI109 断片を混合した後、ライゲーション反応を行うことにより組換え体 DNA を取得した。

該組換え体 DNA を用い、*E. coli* DH5α (東洋紡社より購入) を常法に従って形質転換後、カナマイシン 20μg/ml を含む LB 寒天培地に塗布し、30°C で 1 日間培養して形質転換体を取得した。

該形質転換体より常法に従ってプラスミドを単離した。単離したプラ

スミドDNAを鋳型として、配列番号33、34、35、36、37の塩基配列を有するDNAをそれぞれプライマーとして用い、DyeTerminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステム社製) 及び373A シーケンサー (アプライドバイオシステム社製) を用いて、挿入されたDNA断片の塩基配列を決定し、配列番号41の塩基配列がpRI109のSalI-BamHI部位間に挿入されているプラスミドをpRIyjiBと命名した。

配列番号41記載の塩基配列には、配列番号42記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする塩基配列が含まれていた。

実施例1で得られた*Bacillus subtilis* Marburg168株 (ATCC15563株) の染色体DNAを鋳型とし、配列番号38及び39の塩基配列を有するDNAプライマーと、LA-Taq DNA polymerase (宝酒造社製) を用い、DNA Thermal Cycler 480 (パーキンエルマージャパン社製) でPCRを行った。

PCRは96°Cで30秒間、55°Cで30秒間、72°Cで2分間からなる反応工程を1サイクルとして30サイクル行った後、72°Cで7分間反応させる条件で行った。

PCRにより増幅されたDNA断片を、pT7Blue (宝酒造社より購入) と混合した後、ライゲーション反応を行うことにより組換え体DNAを取得した。

該組換え体DNAを用い、*E. coli* DH5 $\alpha$  (東洋紡社より購入) を常法に従って形質転換後、アンピシリン100 $\mu$ g/mlを含むLB寒天培地に塗布し、30°Cで1日間培養して形質転換体を取得した。

該形質転換体より常法に従ってプラスミドを単離した。単離したプラスミドDNAを常法に従い各種制限酵素で切断して構造を調べ、目的のDNA断片が挿入されているプラスミドであることを確認し、pTSYN2-72と命名した。

pTSYN2-72 DNAをXhoIとBamHIで消化した後、アガロースゲル電気泳動を行い、約1.2kbのDNA断片を常法に従って精製し、XhoI-BamHI処理DNA断片を取得した。

プラスミドpRI109 DNAを、制限酵素SalIとBamHIで消化した後、アガロースゲル電気泳動を行い、約6kbのDNA断片を常法に従って精製し、SalI-BamHI処理pRI109断片を取得した。

上記で取得された、XhoI-BamHI処理DNA断片とSalI-BamHI処理pRI109断片を混合した後、ライゲーション反応を行うことにより組換え体DNAを取得した。

該組換え体DNAを用い、E.coli DH5α（東洋紡社より購入）を常法に従って形質転換後、カナマイシン20μg/mlを含むLB寒天培地に塗布し、30℃で1日間培養して形質転換体を取得した。

該形質転換体より常法に従ってプラスミドを単離した。単離したプラスミドDNAを鋳型として、配列番号33、34、35、36、37の塩基配列を有するDNAをそれぞれプライマーとして用い、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオシステム社製）及び373A シーケンサー（アプライドバイオシステム社製）を用いて、挿入されたDNA断片の塩基配列を決定し、配列番号43の配列がpRI109のSalI-BamHI部位間に挿入されているプラスミドをpSYN2-72と命名した。

配列番号43記載の塩基配列中には、配列番号1記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする塩基配列が含まれていた。

実施例2で得られたpWyjiB DNAを鋳型とし、配列番号38及び39の塩基配列を有するDNAプライマーと、Z-Taq DNA polymerase（宝酒造社製）を用い、DNA Thermal Cycler 480（パーキンエルマージャパン社製）でPCRを行った。

PCRは98℃で20秒間、55℃で20秒間、72℃で30分間からなる反応工

程を1サイクルとして25サイクル反応させる条件で行った。

PCRにより増幅されたDNA断片をXhoIとBamHIで消化した後、アガロースゲル電気泳動を行い、約1.2kbのDNA断片を常法に従って精製し、XhoI-BamHI処理DNA断片を取得した。

プラスミドpRI109 DNAを、制限酵素SalIとBamHIで消化した後、アガロースゲル電気泳動を行い、約6kbのDNA断片を常法に従って精製し、SalI-BamHI処理pRI109断片を取得した。

上記で取得された、XhoI-BamHI処理DNA断片とSalI-BamHI処理pRI109断片を混合した後、ライゲーション反応を行うことにより組換え体DNAを取得した。

該組換え体DNAを用い、*E. coli* DH5 $\alpha$ （東洋紡社より購入）を常法に従って形質転換後、カナマイシン20 $\mu$ g/mlを含むLB寒天培地に塗布し、30°Cで1日間培養して形質転換体を取得した。

該形質転換体より常法に従ってプラスミドを単離した。単離したプラスミドDNAを鋳型として、配列番号33、34、35、36、37の塩基配列を有するDNAをそれぞれプライマーとして用い、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオシステム社製）及び373A シーケンサー（アプライドバイオシステム社製）を用いて、挿入されたDNA断片の塩基配列を決定し、配列番号44記載の塩基配列がpRI109のSalI-BamHI部位間に挿入されているプラスミドをpSYN2-39と命名した。

配列番号44記載の塩基配列中には、配列番号45記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする塩基配列が含まれていた。

#### 実施例5 *C. glutamicum* ATCC13032株へのプラスミド導入と活性評価

ATCC13032株を8mlのブイヨン培地〔普通ブイヨン培地（極東製薬工業社製）20g/l、Bacto Yeast Extract（Difco社製）5g/l〕が入った試験管に接種し、30°Cで一晩振とう培養した。次に、ブイヨン培地250ml

が入った2l三角フラスコ（バッフル付き）に、一晚培養した菌体を5ml 接種し、30℃で4時間振とう培養した。得られた培養液を遠心分離を行い菌体を沈殿させた。上清を除いた後氷冷した30mlのEPB [250mmol/l Sucrose、15%(v/v) glycerol] に懸濁し、遠心分離して再度菌体を沈殿させた。同様にして再度EPBに懸濁した後遠心分離して菌体を分離した後、2mlのEPBに菌体を懸濁した。得られた菌体懸濁液を、0.5mlチューブに0.1mlずつ分注した後、ドライアイスを用いて急速凍結し、形質転換用菌体懸濁液を得た。得られた菌体は-80℃で保存した。

凍結した形質転換用菌体懸濁液0.1mlを氷上で溶解し、43.5℃で10分間保持した後、氷上へ移した。約2 µgのpRI109 DNAを含む水溶液2 µlを添加した後、予め氷冷したE. coli GenePulser キュベット（BioRad社製）に移し、GenePulser（BioRad社製）を用いた電気穿孔法にて、25µF、200Ω、1.5kVの条件で菌体内にDNAを導入した。電気穿孔後すぐに菌体懸濁液全量を1mlのブイヨン培地が入った15ml容テストチューブに移し、30℃で1時間振とう培養した。

得られた培養液を3,500rpm、10分間遠心分離して菌体を沈殿させた。上清を除いた後、新たに0.1mlのブイヨン培地を添加し菌体を懸濁した後、懸濁液をカナマイシン20µg/mlを含むブイヨン寒天培地 [2% Difco Agarで固化させたブイヨン培地] に塗布し、30℃で2日間培養して形質転換体を取得した。

このようにしてpRI109を有するC. glutamicum ATCC13032株を取得した。

上記と同様にして、実施例4で取得したpRIyjiB、pSYN2-72、pSYN2-39各プラスミドを有するC. glutamicum ATCC13032株を取得した。

得られた形質転換体を、それぞれカナマイシン100µg/mlを含むブイヨン培地3mlを入れた試験管に接種し、30℃で24時間振とう培養した。培養液0.2mlを、カナマイシン100µg/mlを含むLMC培地 [オートクレー

ブ滅菌したpre-LMC培地 [ $\text{NH}_4\text{Cl}$  1g/l、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g/l、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  3g/l、Difco Yeast Extract 0.2g/l、Urea 1g/l、Biotin 0.05mg/l、Thiamin 0.5mg/l、Corn Steep Liquor 10g/l、pH7.2) に別に滅菌したGlucose、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{FeSO}_4$ 、 $\text{MnSO}_4$ をそれぞれ終濃度が30g/l、0.1g/l、2mg/l、2mg/lになるよう添加] 2mlを入れた試験管に移し、30℃で5時間振とう培養した。化合物(VII-a) (式中Rはナトリウムである化合物) を終濃度が300mg/lになるよう添加し、更に30℃で16時間振とう反応した。

反応液0.5mlを1.5mlチューブに移し、15,000rpm、2分間遠心分離して菌体を分離した。得られた上清部分をメタノールで5～20倍に希釈し、15,000rpm、2分間遠心分離した後、その一部を用いて、実施例1と同様にHPLC分析を行い、化合物(VIII-a) (式中R<sup>1</sup>はナトリウムである化合物) の検出、定量を行った。定量結果をもとに算出した反応液中の化合物(VIII-a) の濃度を表4に示す。

表 4

プラスミド	化合物 (VIII-a) (mg/l)
pRI109	0.3
pSYN2-72	30
pRIyjiB	61
pSYN2-39	104

#### 実施例 6 コリネ型細菌へのプラスミド導入と活性評価

実施例4で取得したpRIyjiB DNAを、実施例5に記載したATCC13032株の形質転換法と同様の方法で、C. callunae ATCC15991、C. ammoniagenes ATCC6872、B. flavum ATCC14067に導入し、それぞれの菌株から形質転換株を得た。

得られた形質転換体を、それぞれカナマイシン100μg/mlを含むブイ



ヨン培地3mlを入れた試験管に接種し、30℃で24時間振とう培養した。培養液0.5mlを、カナマイシン100 $\mu$ g/ml、Glucose 10g/lを含むTB培地 [Bacto Trypton (Difco社製) 14g、Bacto Yeast Extract 24g (Difco社製) を900mlの水に溶解してからオートクレーブ滅菌し、別にオートクレーブ滅菌したPB [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 23.1g/l、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 125.1g/l] を100ml添加したもの] 5mlを入れた試験管に移し、30℃で5時間振とう培養した。この培養液1mlをアシストチューブ(アシスト社製)に移し、化合物(VII-a) (式中Rはナトリウムである化合物) を終濃度が300mg/lになるよう添加し、更に30℃で16時間振とう反応した。

反応終了後、実施例2に記載した方法で、反応液中の化合物(VIII-a) (式中Rはナトリウムである化合物) の検出、定量を行った。定量結果をもとに算出した培養液中の化合物(VIII-a) の濃度を表5に示す。

表 5

宿主	プラスミド	化合物(VIII-a) (mg/l)
<i>C. callunae</i> ATCC15991 (KY3510)	pRlyjiB	22
<i>C. ammoniagenes</i> ATCC6872 (KY3454)	pRlyjiB	12
<i>B. flavum</i> ATCC14067 (KY10122)	pRlyjiB	23

#### 産業上の利用可能性

本願発明により、新規な水酸化酵素をコードするDNAおよびヒドロキシメチルグルタリルCoA (HMG-CoA) レダクターゼを阻害し、血清コレステロールの低下作用を有する化合物を効率的に製造できる。

#### 「配列表フリーテキスト」

配列番号 3 : 合成DNA

配列番号 4 : 合成DNA

配列番号 5 : 合成DNA  
配列番号 6 : 合成DNA  
配列番号 7 : 合成DNA  
配列番号 8 : 合成DNA  
配列番号 9 : 合成DNA  
配列番号 10 : 合成DNA  
配列番号 11 : 合成DNA  
配列番号 12 : 合成DNA  
配列番号 13 : 合成DNA  
配列番号 14 : 合成DNA  
配列番号 15 : 合成DNA  
配列番号 16 : 合成DNA  
配列番号 17 : 合成DNA  
配列番号 18 : 合成DNA  
配列番号 19 : 合成DNA  
配列番号 20 : 合成DNA  
配列番号 21 : 合成DNA  
配列番号 22 : 合成DNA  
配列番号 23 : 合成DNA  
配列番号 24 : 合成DNA  
配列番号 25 : 合成DNA  
配列番号 26 : 合成DNA  
配列番号 27 : 合成DNA  
配列番号 28 : 合成DNA  
配列番号 29 : 合成DNA  
配列番号 30 : 合成DNA

配列番号 3 1 : 合成 D N A

配列番号 3 2 : 合成 D N A

配列番号 3 3 : 合成 D N A

配列番号 3 4 : 合成 D N A

配列番号 3 5 : 合成 D N A

配列番号 3 6 : 合成 D N A

配列番号 3 7 : 合成 D N A

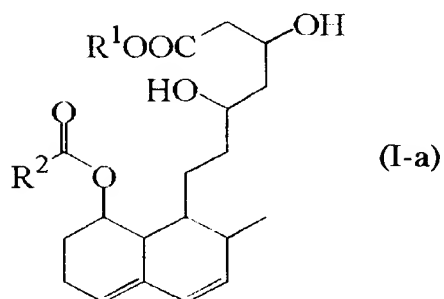
配列番号 3 8 : 合成 D N A

配列番号 3 9 : 合成 D N A

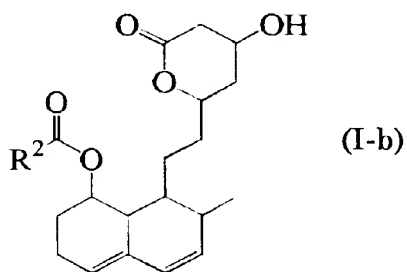
配列番号 4 0 : 合成 D N A

## 請求の範囲

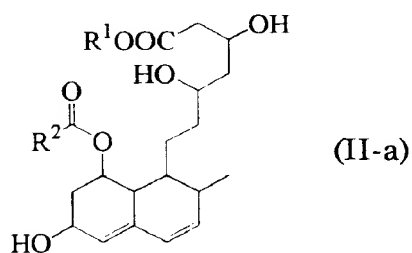
1. Bacillus属に属する微生物由来の蛋白質であり、かつ一般式 (I-a)



(式中、 $R^1$ は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、 $R^2$ は置換もしくは非置換のアルキルまたは置換もしくは非置換のアリールを表す)で表される化合物〔以下、化合物 (I-a) という〕または一般式 (I-b)

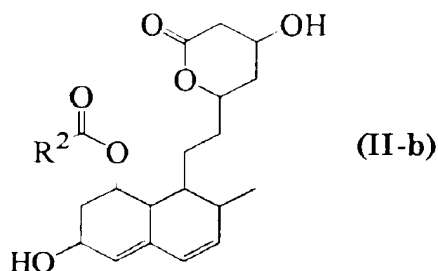


(式中、 $R^2$ は前記と同義)で表される、化合物 (I-a) のラクトン体〔以下、化合物 (I-b) という〕から、一般式 (II-a)



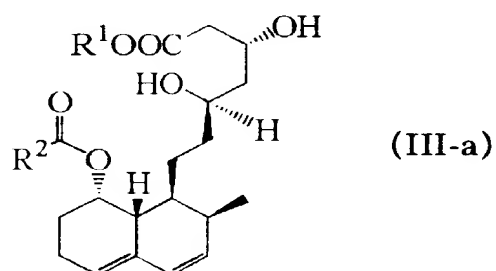
(式中、 $R^1$ および $R^2$ は前記と同義)で表される化合物〔以下、化合物

(II-a) という] または一般式 (II-b)

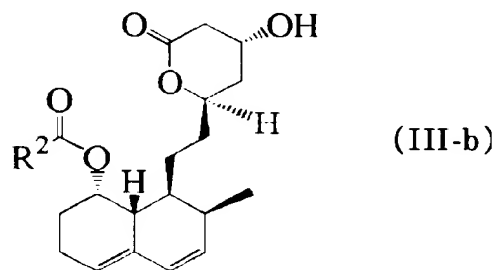


(式中、 $R^2$ は前記と同義)で表される、化合物(II-a)のラクトン体[以下、化合物(II-b)という]を生成する活性を有する蛋白質。

2. Bacillus属に属する微生物由来の蛋白質であり、かつ一般式(III-a)

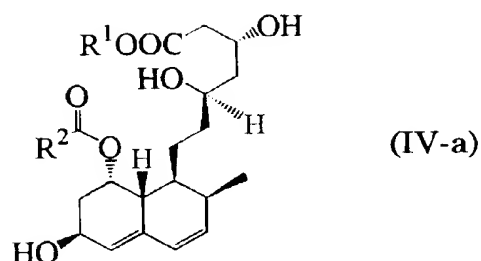


(式中、 $R^1$ は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、 $R^2$ は置換もしくは非置換のアルキルまたは置換もしくは非置換のアリールを表す)で表される化合物[以下、化合物(III-a)という]または一般式(III-b)

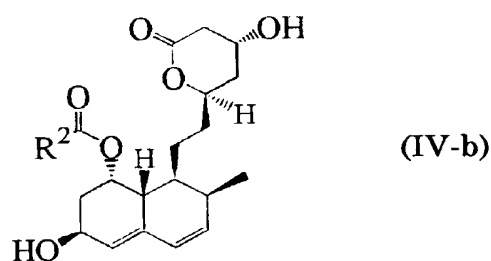


(式中、 $R^2$ は前記と同義)で表される、化合物(III-a)のラクトン

体〔以下、化合物（III-b）という〕から、一般式（IV-a）

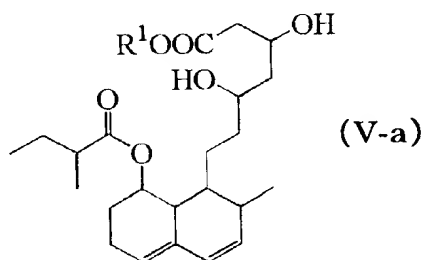


（式中、 $R^1$ および $R^2$ は前記と同義）で表される化合物〔以下、化合物（IV-a）という〕または一般式（IV-b）

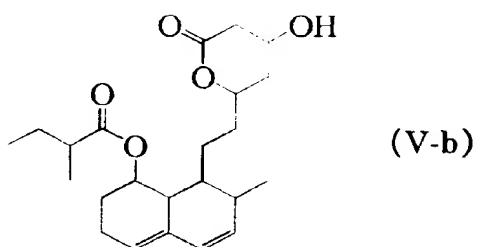


（式中、 $R^2$ は前記と同義）で表される、化合物（IV-a）のラクトン体〔以下、化合物（IV-b）という〕を生成する活性を有する蛋白質。

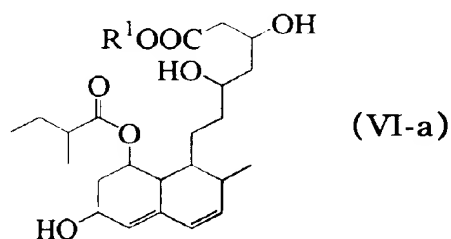
3. Bacillus属に属する微生物由来の蛋白質であり、かつ一般式（V-a）



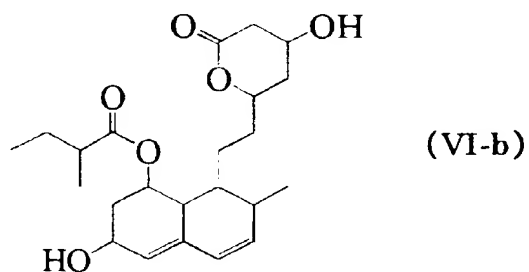
（式中、 $R^1$ は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表す）で表される化合物〔以下、化合物（V-a）という〕または一般式（V-b）



で表される、化合物 (V-a) のラクトン体 [以下、化合物 (V-b) という] から、一般式 (VI-a)

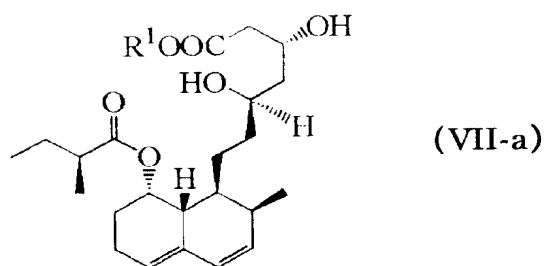


(式中、R<sup>1</sup>は前記と同義) で表される化合物 [以下、化合物 (VI-a) という] または一般式 (VI-b)

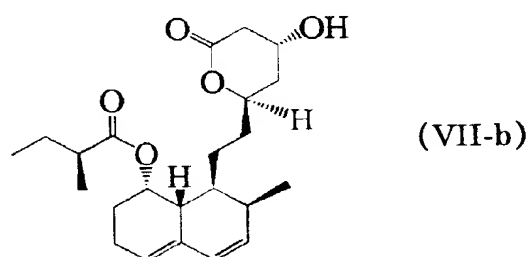


で表される、化合物 (VI-a) のラクトン体 [以下、化合物 (VI-b) という] を生成する活性を有する蛋白質。

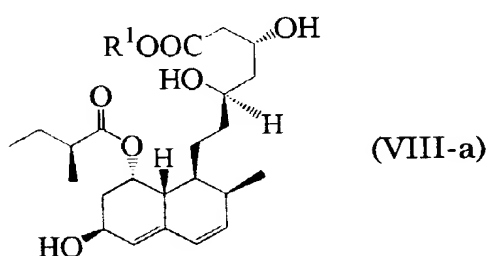
4. Bacillus属に属する微生物由来の蛋白質であり、かつ一般式 (VII-a)



(式中、 $R^1$ は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表す)で表される化合物〔以下、化合物(VII-a)という〕または一般式(VII-b)

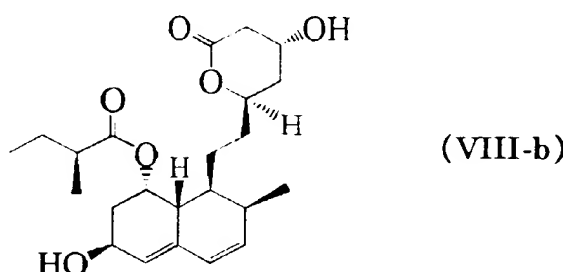


で表される、化合物(VII-a)のラクトン体〔以下、化合物(VII-b)という〕から、一般式(VIII-a)



(式中、 $R^1$ は前記と同義)で表される化合物〔以下、化合物(VIII-a)という〕または一般式(VIII-b)





で表される、化合物 (VIII-a) のラクトン体 [以下、化合物 (VIII-b) という] を生成する活性を有する蛋白質。

5. Bacillus属に属する微生物がB. subtilis、B. megaterium、B. laterosporus、B. sphaericus、B. pumilus、B. stearothermophilus、B. cereus、B. badius、B. brevis、B. alvei、B. circulans、およびB. maceransから選ばれる微生物である、請求項 1～4 いずれか 1 項に記載の蛋白質。

6. Bacillus属に属する微生物がB. subtilis ATCC6051株、B. megaterium ATCC10778株、B. megaterium ATCC11562株、B. megaterium ATCC13402株、B. megaterium ATCC15177株、B. megaterium ATCC15450株、B. megaterium ATCC19213株、B. megaterium IAM1032株、B. laterosporus ATCC4517株、B. pumilus FERM BP-2064株、B. badius ATCC14574株、B. brevis NRRL B-8029株、B. alvei ATCC6344株、B. circulans NTCT-2610株、およびB. macerans NCIMB-9368株から選ばれる微生物である、請求項 1～5 いずれか 1 項に記載の蛋白質。

7. Bacillus属に属する微生物がBacillus sp. FERM BP-6029株、およびBacillus sp. FERM BP-6030株から選ばれる微生物である、請求項 1～5 いずれか 1 項に記載の蛋白質。

8. 配列番号 1 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質。

9. 配列番号 1 記載のアミノ酸配列から 1 以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有し、かつ化合物 (I-a) または

化合物 (I-b) から化合物 (II-a) または化合物 (II-b) を生成する活性を有する蛋白質。

10. 蛋白質が、配列番号 4 2 又は 4 5 記載のアミノ酸配列を有する、請求項 9 記載の蛋白質。

11. 化合物 (I-a) が化合物 (III-a) であり、化合物 (I-b) が化合物 (III-b) であり、化合物 (II-a) が化合物 (IV-a) であり、化合物 (II-b) が化合物 (IV-b) である、請求項 9 記載の蛋白質。

12. 化合物 (I-a) が化合物 (V-a) であり、化合物 (I-b) が化合物 (V-b) であり、化合物 (II-a) が化合物 (VI-a) であり、化合物 (II-b) が化合物 (VI-b) である、請求項 9 記載の蛋白質。

13. 化合物 (I-a) が化合物 (VII-a) であり、化合物 (I-b) が化合物 (VII-b) であり、化合物 (II-a) が化合物 (VIII-a) であり、化合物 (II-b) が化合物 (VIII-b) である、請求項 9 記載の蛋白質。

14. 配列番号 2 記載の塩基配列を有する、単離された DNA。

15. 請求項 1 4 記載の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ化合物 (I-a) または化合物 (I-b) から化合物 (II-a) または化合物 (II-b) を生成する活性を有する蛋白質をコードする、単離された DNA。

16. DNA が、配列番号 4 1、4 3 および 4 4 記載の塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を有する、請求項 1 5 記載の DNA。

17. 請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の蛋白質をコードする、単離された DNA。

18. 化合物 (I-a) が化合物 (III-a) であり、化合物 (I-b) が化合物 (III-b) であり、化合物 (II-a) が化合物 (IV-a) であり、化合物 (II-b) が化合物 (IV-b) である、請求項 1 5 記載の DNA。

19. 化合物 (I-a) が化合物 (V-a) であり、化合物 (I-b) が化合物 (V-b) であり、化合物 (II-a) が化合物 (VI-a) であり、化合物

(II-b) が化合物 (VI-b) である、請求項 15 記載の DNA。

20. 化合物 (I-a) が化合物 (VII-a) であり、化合物 (I-b) が化合物 (VII-b) であり、化合物 (II-a) が化合物 (VIII-a) であり、化合物 (II-b) が化合物 (VIII-b) である、請求項 15 記載の DNA。

21. 請求項 14 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の DNA を含む組換え DNA ベクター。

22. 請求項 21 記載の組換え DNA ベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

23. 形質転換体が Escherichia 属、Bacillus 属、Corynebacterium 属、および Streptomyces 属から選ばれる微生物に属する、請求項 22 記載の形質転換体。

24. 形質転換体が Escherichia coli、Bacillus subtilis、Bacillus megaterium、Corynebacterium glutamicum、Corynebacterium ammoniagenes、Corynebacterium callunae および Streptomyces lividans から選ばれる微生物に属する微生物である、請求項 22 または 23 記載の形質転換体。

25. 請求項 22 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の形質転換体、該形質転換体の培養物または該培養物の処理物を酵素源として用い、化合物 (I-a) または化合物 (I-b) を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に化合物 (II-a) または化合物 (II-b) を生成、蓄積させ、該水性媒体から化合物 (II-a) または化合物 (II-b) を採取することを特徴とする、化合物 (II-a) または化合物 (II-b) の製造法。

26. 請求項 22 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の形質転換体、該形質転換体の培養物または該培養物の処理物を酵素源として用い、化合物 (III-a) または化合物 (III-b) を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に化合物 (IV-a) または化合物 (IV-b) を生成、蓄積させ、該水性媒体から化合物 (IV-a) または化合物 (IV-b) を採取することを特徴と

する、化合物 (IV-a) または化合物 (IV-b) の製造法。

27. 請求項 22～24のいずれか 1 項に記載の形質転換体、該形質転換体の培養物または該培養物の処理物を酵素源として用い、化合物 (V-a) または化合物 (V-b) を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に化合物 (VI-a) または化合物 (VI-b) を生成、蓄積させ、該水性媒体から化合物 (VI-a) または化合物 (VI-b) を採取することを特徴とする、化合物 (VI-a) または化合物 (VI-b) の製造法。

28. 請求項 22～24のいずれか 1 項に記載の形質転換体、該形質転換体の培養物または該培養物の処理物を酵素源として用い、化合物 (VII-a) または化合物 (VII-b) を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に化合物 (VIII-a) または化合物 (VIII-b) を生成、蓄積させ、該水性媒体から化合物 (VIII-a) または化合物 (VIII-b) を採取することを特徴とする、化合物 (VIII-a) または化合物 (VIII-b) の製造法。

29. 化合物 (II-b) が、化合物 (II-a) よりラク톤を形成させて得られた化合物 (II-b) である、請求項 25 記載の製造法。

30. 化合物 (II-a) が、化合物 (II-b) のラク톤を開環させて得られた化合物 (II-a) である、請求項 25 記載の製造法。

31. 化合物 (IV-b) が、化合物 (IV-a) よりラク톤を形成させて得られた化合物 (IV-b) である、請求項 26 記載の製造法。

32. 化合物 (IV-a) が、化合物 (IV-b) のラク톤を開環させて得られた化合物 (IV-a) である、請求項 26 記載の製造法。

33. 化合物 (VI-b) が、化合物 (VI-a) よりラク톤を形成させて得られた化合物 (VI-b) である、請求項 27 記載の製造法。

34. 化合物 (VI-a) が、化合物 (VI-b) のラク톤を開環させて得られた化合物 (VI-a) である、請求項 27 記載の製造法。

35. 化合物 (VIII-b) が、化合物 (VIII-a) よりラク톤を形成させて得られた化合物 (VIII-b) である、請求項 28 記載の製造法。

36. 化合物 (VIII-a) が、化合物 (VIII-b) のラクトンを開環させて得られた化合物 (VIII-a) である、請求項 28 記載の製造法。

37. 形質転換体の培養物の処理物が、培養菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩砕物、該菌体の溶媒処理物等の菌体処理物、菌体の蛋白分画物、菌体および菌体処理物の固定化物から選ばれる処理物である、請求項 25 ～ 28 のいずれか 1 項に記載の製造法。

38. 請求項 22 ～ 24 のいずれか 1 項に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に請求項 1 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の蛋白質を生成、蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする、該蛋白質の製造法。

39. 配列番号 2、41、43 および 44 記載の塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列中の連続した 5 ～ 60 塩基からなる配列に相当するオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチドと相補的な配列に相当するオリゴヌクレオチド。



配 列 表  
SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120> A Process for producing HMG-CoA Reductase inhibitor

<130> H11-0011T4

<160> 45

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 396

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 1

Met Asn Val Leu Asn Arg Arg Gln Ala Leu Gln Arg Ala Leu Leu Asn

1                      5                      10                      15

Gly Lys Asn Lys Gln Asp Ala Tyr His Pro Phe Pro Trp Tyr Glu Ser

20                      25                      30

Met Arg Lys Asp Ala Pro Val Ser Phe Asp Glu Glu Asn Gln Val Trp





35	40	45
Ser Val Phe Leu Tyr Asp Asp Val Lys Lys Val Val Gly Asp Lys Glu		
50	55	60
Leu Phe Ser Ser Cys Met Pro Gln Gln Thr Ser Ser Ile Gly Asn Ser		
65	70	75 80
Ile Ile Asn Met Asp Pro Pro Lys His Thr Lys Ile Arg Ser Val Val		
85	90	95
Asn Lys Ala Phe Thr Pro Arg Val Met Lys Gln Trp Glu Pro Arg Ile		
100	105	110
Gln Glu Ile Thr Asp Glu Leu Ile Gln Lys Phe Gln Gly Arg Ser Glu		
115	120	125
Phe Asp Leu Val His Asp Phe Ser Tyr Pro Leu Pro Val Ile Val Ile		
130	135	140
Ser Glu Leu Leu Gly Val Pro Ser Ala His Met Glu Gln Phe Lys Ala		
145	150	155 160
Trp Ser Asp Leu Leu Val Ser Thr Pro Lys Asp Lys Ser Glu Glu Ala		
165	170	175



Glu Lys Ala Phe Leu Glu Glu Arg Asp Lys Cys Glu Glu Glu Leu Ala

180

185

190

Ala Phe Phe Ala Gly Ile Ile Glu Glu Lys Arg Asn Lys Pro Glu Gln

195

200

205

Asp Ile Ile Ser Ile Leu Val Glu Ala Glu Glu Thr Gly Glu Lys Leu

210

215

220

Ser Gly Glu Glu Leu Ile Pro Phe Cys Thr Leu Leu Leu Val Ala Gly

225

230

235

240

Asn Glu Thr Thr Thr Asn Leu Ile Ser Asn Ala Met Tyr Ser Ile Leu

245

250

255

Glu Thr Pro Gly Val Tyr Glu Glu Leu Arg Ser His Pro Glu Leu Met

260

265

270

Pro Gln Ala Val Glu Glu Ala Leu Arg Phe Arg Ala Pro Ala Pro Val

275

280

285

Leu Arg Arg Ile Ala Lys Arg Asp Thr Glu Ile Gly Gly His Leu Ile

290

295

300

Lys Glu Gly Asp Met Val Leu Ala Phe Val Ala Ser Ala Asn Arg Asp

305

310

315

320



Glu Ala Lys Phe Asp Arg Pro His Met Phe Asp Ile Arg Arg His Pro

325

330

335

Asn Pro His Ile Ala Phe Gly His Gly Ile His Phe Cys Leu Gly Ala

340

345

350

Pro Leu Ala Arg Leu Glu Ala Asn Ile Ala Leu Thr Ser Leu Ile Ser

355

360

365

Ala Phe Pro His Met Glu Cys Val Ser Ile Thr Pro Ile Glu Asn Ser

370

375

380

Val Ile Tyr Gly Leu Lys Ser Phe Arg Val Lys Met

385

390

395

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1191

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bacillus subtilis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1191)



&lt;400&gt; 2

atg aat gtg tta aac cgc cgg caa gcc ttg cag cga gcg ctg ctc aat 48

Met Asn Val Leu Asn Arg Arg Gln Ala Leu Gln Arg Ala Leu Leu Asn

1 5 10 15

ggg aaa aac aaa cag gat gcg tat cat ccg ttt cca tgg tat gaa tcg 96

Gly Lys Asn Lys Gln Asp Ala Tyr His Pro Phe Pro Trp Tyr Glu Ser

20 25 30

atg aga aag gat gcg cct gtt tcc ttt gat gaa gaa aac caa gtg tgg 144

Met Arg Lys Asp Ala Pro Val Ser Phe Asp Glu Glu Asn Gln Val Trp

35 40 45

agc gtt ttt ctt tat gat gat gtc aaa aaa gtt gtt ggg gat aaa gag 192

Ser Val Phe Leu Tyr Asp Asp Val Lys Lys Val Val Gly Asp Lys Glu

50 55 60

ttg ttt tcc agt tgc atg ccg cag cag aca agc tct att gga aat tcc 240

Leu Phe Ser Ser Cys Met Pro Gln Gln Thr Ser Ser Ile Gly Asn Ser

65 70 75 80

atc att aac atg gac cgc cgc aag cat aca aaa atc cgt tca gtc gtg 288

Ile Ile Asn Met Asp Pro Pro Lys His Thr Lys Ile Arg Ser Val Val

85 90 95

aac aaa gcc ttt act cgc cgc gtg atg aag caa tgg gaa cgc aga att 336





Asn Lys Ala Phe Thr Pro Arg Val Met Lys Gln Trp Glu Pro Arg Ile  
 100 105 110

caa gaa atc aca gat gaa ctg att caa aaa ttt cag ggg cgc agt gag 384  
 Gln Glu Ile Thr Asp Glu Leu Ile Gln Lys Phe Gln Gly Arg Ser Glu  
 115 120 125

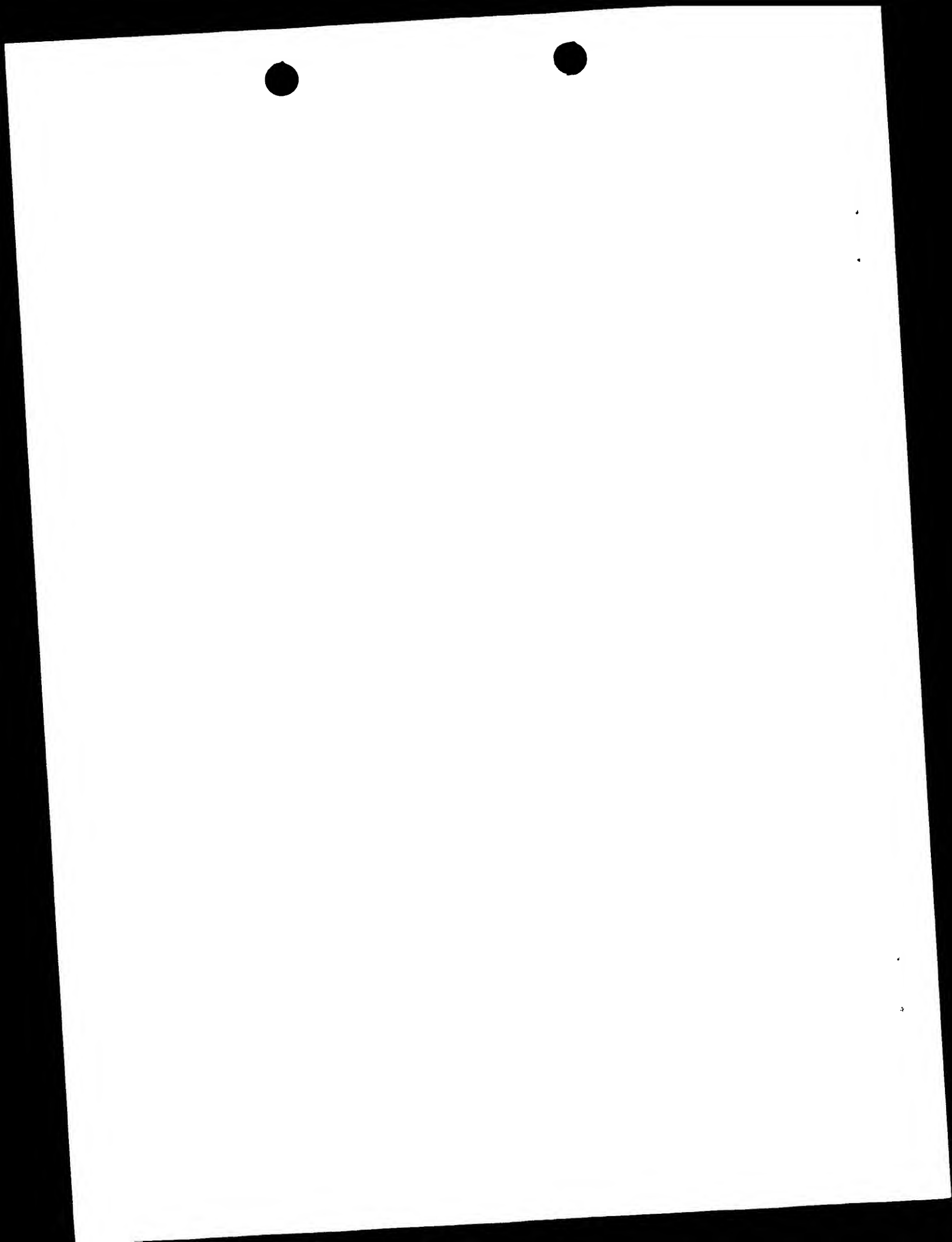
ttt gac ctt gtt cac gat ttt tca tac ccg ctt ccg gtt att gtg ata 432  
 Phe Asp Leu Val His Asp Phe Ser Tyr Pro Leu Pro Val Ile Val Ile  
 130 135 140

tct gag ctg ctg gga gtg cct tca gcg cat atg gaa cag ttt aaa gca 480  
 Ser Glu Leu Leu Gly Val Pro Ser Ala His Met Glu Gln Phe Lys Ala  
 145 150 155 160

tgg tct gat ctt ctg gtc agt aca ccg aag gat aaa agt gaa gaa gct 528  
 Trp Ser Asp Leu Leu Val Ser Thr Pro Lys Asp Lys Ser Glu Glu Ala  
 165 170 175

gaa aaa gcc ttt ttg gaa gaa cga gat aag tgt gag gaa gaa ctg gcc 576  
 Glu Lys Ala Phe Leu Glu Glu Arg Asp Lys Cys Glu Glu Glu Leu Ala  
 180 185 190

gcg ttt ttt gcc ggc atc ata gaa gaa aag cga aac aaa ccg gaa cag 624  
 Ala Phe Phe Ala Gly Ile Ile Glu Glu Lys Arg Asn Lys Pro Glu Gln  
 195 200 205



gat att att tct att tta gtg gaa gcg gaa gaa aca ggc gag aag ctg 672  
Asp Ile Ile Ser Ile Leu Val Glu Ala Glu Glu Thr Gly Glu Lys Leu  
210 215 220

tcc ggt gaa gag ctg att ccg ttt tgc acg ctg ctg ctg gtg gcc gga 720  
Ser Gly Glu Glu Leu Ile Pro Phe Cys Thr Leu Leu Leu Val Ala Gly  
225 230 235 240

aat gaa acc act aca aac ctg att tca aat gcg atg tac agc ata tta 768  
Asn Glu Thr Thr Thr Asn Leu Ile Ser Asn Ala Met Tyr Ser Ile Leu  
245 250 255

gaa acg cca ggc gtt tac gag gaa ctg cgc agc cat cct gaa ctg atg 816  
Glu Thr Pro Gly Val Tyr Glu Glu Leu Arg Ser His Pro Glu Leu Met  
260 265 270

cct cag gca gtg gag gaa gcc ttg cgt ttc aga gcg ccg gcc ccg gtt 864  
Pro Gln Ala Val Glu Glu Ala Leu Arg Phe Arg Ala Pro Ala Pro Val  
275 280 285

ttg agg cgc att gcc aag cgg gat acg gag atc ggg ggg cac ctg att 912  
Leu Arg Arg Ile Ala Lys Arg Asp Thr Glu Ile Gly Gly His Leu Ile  
290 295 300

aaa gaa ggt gat atg gtt ttg gcg ttt gtg gca tcg gca aat cgt gat 960



Lys Glu Gly Asp Met Val Leu Ala Phe Val Ala Ser Ala Asn Arg Asp

305 310 315 320

gaa gca aag ttt gac aga ccg cac atg ttt gat atc cgc cgc cat ccc 1008

Glu Ala Lys Phe Asp Arg Pro His Met Phe Asp Ile Arg Arg His Pro

325 330 335

aat ccg cat att gcg ttt ggc cac ggc atc cat ttt tgc ctt ggg gcc 1056

Asn Pro His Ile Ala Phe Gly His Gly Ile His Phe Cys Leu Gly Ala

340 345 350

ccg ctt gcc cgt ctt gaa gca aat atc gcg tta acg tct ttg att tct 1104

Pro Leu Ala Arg Leu Glu Ala Asn Ile Ala Leu Thr Ser Leu Ile Ser

355 360 365

gct ttt cct cat atg gag tgc gtc agt atc act ccg att gaa aac agt 1152

Ala Phe Pro His Met Glu Cys Val Ser Ile Thr Pro Ile Glu Asn Ser

370 375 380

gtg ata tac gga tta aag agc ttc cgt gtg aaa atg taa 1191

Val Ile Tyr Gly Leu Lys Ser Phe Arg Val Lys Met

385 390 395

<210> 3

<211> 39



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 3

tttgatccg aattcaaaag tgctggcgct gttccgttt

39

<210> 4

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 4

gtgggatccg tegaccactt ttttcacgat gttcactccc c

41

<210> 5

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence





<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 5

ccaggatcct ctagatgggtg aaatggttgt tgccgctct

39

<210> 6

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 6

tcaggatccc ccgggtgagc ggcaaatcca cccaccctg

39

<210> 7

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>



<223> Synthetic DNA

<400> 7

taagegcgcc ccgggttaat tggatgggcg aaagctc

37

<210> 8

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 8

atcgcgcgcg tcgacgatag cggcagaaaa ttggcggca

39

<210> 9

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA



<400> 9

agcggatccg aattcgctgg aatcaaaagt cggccaga

38

<210> 10

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 10

tcaggatccg tcgactgaga aaacacaaac gccccctc

38

<210> 11

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 11

atgggatcct ctagacatgt tgtagtttgg gttggaatc

39



<210> 12

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 12

gccggatecca gatctggcat cacacaacaa taaatacacc gc

42

<210> 13

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 13

tctggatcct ctagaagaga acacaaagag tacgaatgc

39





<210> 14

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 14

aaaggatccc ccgggtttac cagccagcgc aacaaagtca t

41

<210> 15

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 15

cctgaattct ctagaaggct ttcaccacgt attttgctg

39

<210> 16

<211> 41



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 16

tctgaattcc ccgggagaac aaaatgccaa aagcctgagtc

41

<210> 17

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 17

aataactagta caattgcac gtcaactgca tctt

34

<210> 18

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 18

gtgggatccg tcgaccatt ttttcacgat gttcactccc c

41

<210> 19

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 19

gaaactagtt cttcaaaaga aaaaaagagt gtaa

34

<210> 20

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>



<223> Synthetic DNA

<400> 20

tcaggatccc ccgggtgagc ggcaaatcca cccaccctg

39

<210> 21

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 21

taaactagta gccaatcgat taaattgttt agtg

34

<210> 22

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA





<400> 22

ggaggtacct tatgccccgt caaacgcaac gaga

34

<210> 23

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 23

aggactagtc aaatggaaaa attgatgttt catc

34

<210> 24

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 24

tcaggatccg tcgactgaga aaacacaaac gccccctc

38



<210> 25

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 25

ggtactagta aggaaacaag cccgattcct cagc

34

<210> 26

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 26

gccggatcca gatctggcat cacacaacaa taaatacacc gc

42



<210> 27

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 27

ttggatccac tagtaatgtg ttaaaccgcc ggcaagcc

38

<210> 28

<211>

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 28

aaaggatccc ccgggtttac cagccagcgc aacaaagtca t

41

<210> 29



<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 29

atgactagta aacaggcaag cgcaatacct cagc

34

<210> 30

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 30

tttggtagct tacattcctg tccaaacgtc ttte

34

<210> 31

<211> 29

<212> DNA





<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 31

agcggtcgac aatgaatgtg ttaaaccgc

29

<210> 32

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 32

acgcgatcc ttacattttc acacggaag

29

<210> 33

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 33

cgccagggtt ttcccagtcg cgac

24

<210> 34

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 34

cgcaatatgc ggattggg

18

<210> 35

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA



<400> 35

tttccggcca ccagcagc

18

<210> 36

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 36

taaccggaag cgggtatg

18

<210> 37

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 37



aaggaaacag gcgcatcc

18

<210> 38

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 38

tcgcctcgag tcgaggaggt cgactaatat gaacgttctg aaccgccgtc aagccttgca 60

gcgagcg

67

<210> 39

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 39





tcgcggatcc ttacattttc acacggaa

28

<210> 40

<211> 715

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 40

cctgcaggtc atcacccgag caggcgaccc gaacgttcgg aggctcctcg ctgtccattc 60

gtccccctgg cgcggtatga accgccgcct catagtgcag ttigatectg acgagcccag 120

catgtctgcg cccaccttcg cggaacctga ccagggtccg ctacggggcg gccggaaggt 180

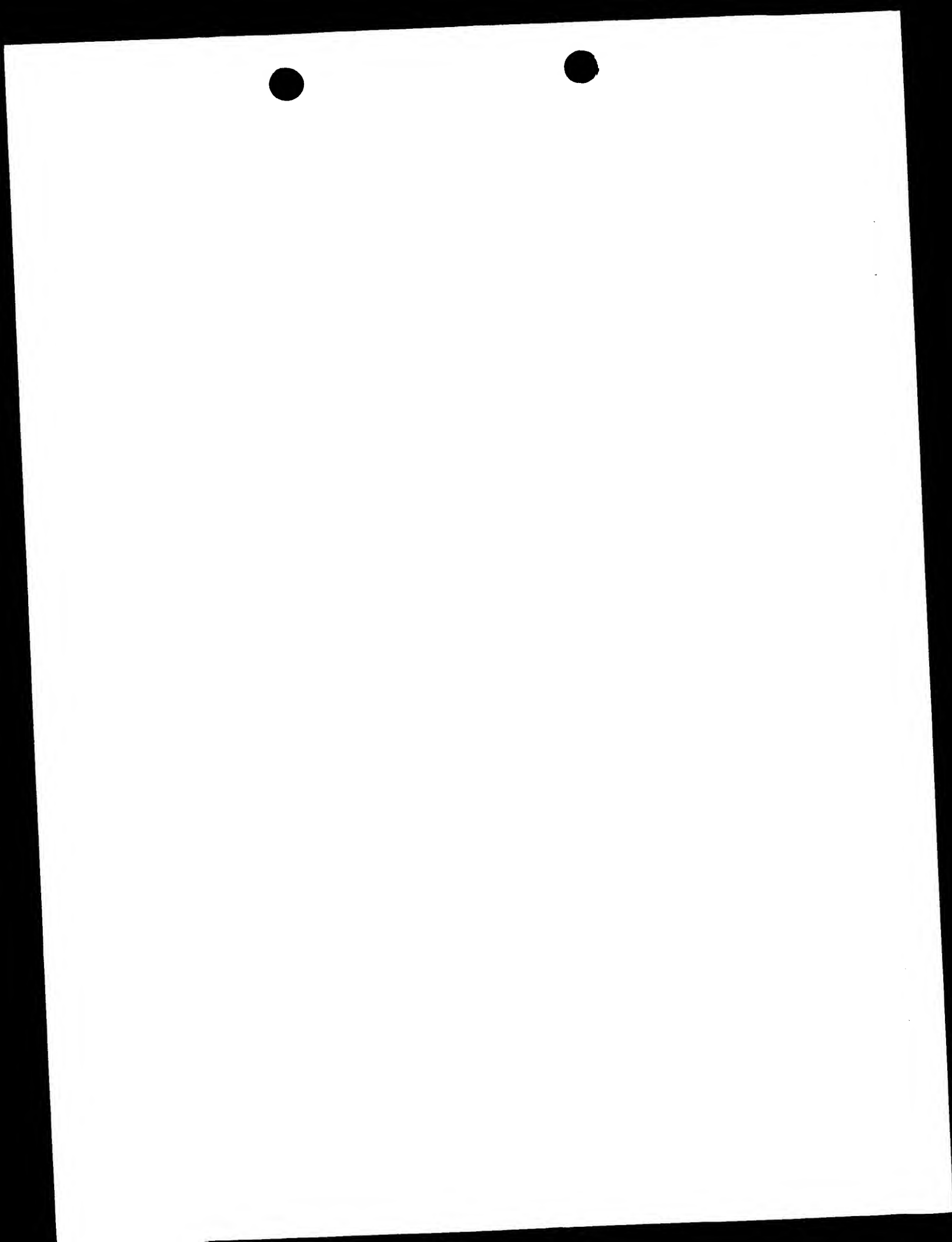
gaatgctagg catgatctaa ccctcgggtct ctggcgtcgc gactgcgaaa tttcgcgagg 240

gtttccgaga aggtgattgc gcttcgcaga tctcgtggac ggcttggttg acgccctccg 300

cccattgggt gatggtggea ccatttggct gttgactcct ggtgcaggaa aacgtggaac 360

tattgtcca ggtgaaattt ccgaatccgc acaattggca ggcctcgtcc agaccaccgc 420

agagcgtctc ggtgattggc agggcagctg cttggtcgcg cgcggcgcga tgaagaagta 480



agaattagcc gaaaacacct tccagccagg cgatttgctt aagttagaag gtgtggctag 540

tattctaaga gtgctcatga ggaagcggaa agcttttaag agagcatgat gcggcttttag 600

ctcagctgga agagcaactg gtttacaccc agtaggtcgg gggttcgac cagctgtgaa 660

caattgcact ttggatctaa ttaagggatt agtcgactat ggatccccgg gtacc 715

<210> 41

<211> 1204

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(1195)

<400> 41

gtcgaca atg aat gtg tta aac cgc cgg caa gcc ttg cag cga gcg ctg 49

Met Asn Val Leu Asn Arg Arg Gln Ala Leu Gln Arg Ala Leu

1

5

10

ctc aat ggg aaa aac aaa cag gat gcg tat cat ccg ttt cca tgg tat 97

Leu Asn Gly Lys Asn Lys Gln Asp Ala Tyr His Pro Phe Pro Trp Tyr

15

20

25

30



gaa tcg atg aga aag gat gcg cct gtt tcc ttt gat gaa gaa aac caa 145  
Glu Ser Met Arg Lys Asp Ala Pro Val Ser Phe Asp Glu Glu Asn Gln  
35 40 45

gtg tgg agc gtt ttt ctt tat gat gat gtc aaa aaa gtt gtt ggg gat 193  
Val Trp Ser Val Phe Leu Tyr Asp Asp Val Lys Lys Val Val Gly Asp  
50 55 60

aaa gag ttg ttt tcc agt tgc atg ccg cag cag aca agc tct att gga 241  
Lys Glu Leu Phe Ser Ser Cys Met Pro Gln Gln Thr Ser Ser Ile Gly  
65 70 75

aat tcc atc att aac atg gac ccg ccg aag cat aca aaa atc cgt tca 289  
Asn Ser Ile Ile Asn Met Asp Pro Pro Lys His Thr Lys Ile Arg Ser  
80 85 90

gtc gtg aac aaa gcc ttt act ccg cgc gcg atg aag caa tgg gaa ccg 337  
Val Val Asn Lys Ala Phe Thr Pro Arg Ala Met Lys Gln Trp Glu Pro  
95 100 105 110

aga att caa gaa atc aca gat gaa ctg att caa aaa ttt cag ggg cgc 385  
Arg Ile Gln Glu Ile Thr Asp Glu Leu Ile Gln Lys Phe Gln Gly Arg  
115 120 125

agt gag ttt gac ctt gtt cac gat ttt tca tac ccg ctt ccg gtt att 433  
Ser Glu Phe Asp Leu Val His Asp Phe Ser Tyr Pro Leu Pro Val Ile  
130 135 140



gtg ata tct gag ctg ctg gga gtg cct tca gcg cat atg gaa cag ttt 481  
Val Ile Ser Glu Leu Leu Gly Val Pro Ser Ala His Met Glu Gln Phe

145

150

155

aaa gca tgg tct gat ctt ctg gtc agt aca ccg aag gat aaa agt gaa 529  
Lys Ala Trp Ser Asp Leu Leu Val Ser Thr Pro Lys Asp Lys Ser Glu

160

165

170

gaa gct gaa aaa gcc ttt ttg gaa gaa cga gat aag tgt gag gaa gaa 577  
Glu Ala Glu Lys Ala Phe Leu Glu Glu Arg Asp Lys Cys Glu Glu Glu

175

180

185

190

ctg gcc gcg ttt ttt gcc ggc atc ata gaa gaa aag cga aac aaa ccg 625  
Leu Ala Ala Phe Phe Ala Gly Ile Ile Glu Glu Lys Arg Asn Lys Pro

195

200

205

gaa cag gat att att tct att tta gtg gaa gcg gaa gaa aca ggc gag 673  
Glu Gln Asp Ile Ile Ser Ile Leu Val Glu Ala Glu Glu Thr Gly Glu

210

215

220

aag ctg tcc ggt gaa gag ctg att ccg ttg tgc acg ctg ctg ctg gtg 721  
Lys Leu Ser Gly Glu Glu Leu Ile Pro Leu Cys Thr Leu Leu Leu Val

225

230

235

gcc gga aat gaa acc act aca aac ctg att tca aat gcg atg tac agc 769  
Ala Gly Asn Glu Thr Thr Thr Asn Leu Ile Ser Asn Ala Met Tyr Ser

240

245

250

ata tta gaa acg cca ggc gtt tac gag gaa ctg cgc agc cat cct gaa 817





Ile Leu Glu Thr Pro Gly Val Tyr Glu Glu Leu Arg Ser His Pro Glu  
 255 260 265 270

ctg atg cct cag gca gtg gag gaa gcc ttg cgt ttc aga gcg ccg gcc 865  
 Leu Met Pro Gln Ala Val Glu Glu Ala Leu Arg Phe Arg Ala Pro Ala  
 275 280 285

ccg gtt ttg agg cgc att gcc aag cgg gat acg gag atc ggg ggg cac 913  
 Pro Val Leu Arg Arg Ile Ala Lys Arg Asp Thr Glu Ile Gly Gly His  
 290 295 300

ctg att aaa gaa ggt gat atg gtt ttg gcg ttt gtg gca tcg gca aat 961  
 Leu Ile Lys Glu Gly Asp Met Val Leu Ala Phe Val Ala Ser Ala Asn  
 305 310 315

cgt gat gaa gca aag ttt gac aga ccg cac atg ttt gat atc cgc cgc 1009  
 Arg Asp Glu Ala Lys Phe Asp Arg Pro His Met Phe Asp Ile Arg Arg  
 320 325 330

cat ccc aat ccg cat att gcg ttt ggc cac ggc atc cat ttt tgc ctt 1057  
 His Pro Asn Pro His Ile Ala Phe Gly His Gly Ile His Phe Cys Leu  
 335 340 345 350

ggg gcc ccg ctt gcc cgt ctt gaa gca aat atc gcg tta acg tct ttg 1105  
 Gly Ala Pro Leu Ala Arg Leu Glu Ala Asn Ile Ala Leu Thr Ser Leu  
 355 360 365

att tct gct ttt cct cat atg gag tgc gtc agt atc act ccg att gaa 1153  
 Ile Ser Ala Phe Pro His Met Glu Cys Val Ser Ile Thr Pro Ile Glu



370

375

380

aac agt gtg ata tac gga tta aag agc ttc cgt gtg aaa atg taaggatcc 1204

Asn Ser Val Ile Tyr Gly Leu Lys Ser Phe Arg Val Lys Met

385

390

395

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 396

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus subtilis

&lt;400&gt; 42

Met Asn Val Leu Asn Arg Arg Gln Ala Leu Gln Arg Ala Leu Leu Asn

1

5

10

15

Gly Lys Asn Lys Gln Asp Ala Tyr His Pro Phe Pro Trp Tyr Glu Ser

20

25

30

Met Arg Lys Asp Ala Pro Val Ser Phe Asp Glu Glu Asn Gln Val Trp

35

40

45

Ser Val Phe Leu Tyr Asp Asp Val Lys Lys Val Val Gly Asp Lys Glu

50

55

60

Leu Phe Ser Ser Cys Met Pro Gln Gln Thr Ser Ser Ile Gly Asn Ser

65

70

75

80



Ile Ile Asn Met Asp Pro Pro Lys His Thr Lys Ile Arg Ser Val Val  
85 90 95

Asn Lys Ala Phe Thr Pro Arg Ala Met Lys Gln Trp Glu Pro Arg Ile  
100 105 110

Gln Glu Ile Thr Asp Glu Leu Ile Gln Lys Phe Gln Gly Arg Ser Glu  
115 120 125

Phe Asp Leu Val His Asp Phe Ser Tyr Pro Leu Pro Val Ile Val Ile  
130 135 140

Ser Glu Leu Leu Gly Val Pro Ser Ala His Met Glu Gln Phe Lys Ala  
145 150 155 160

Trp Ser Asp Leu Leu Val Ser Thr Pro Lys Asp Lys Ser Glu Glu Ala  
165 170 175

Glu Lys Ala Phe Leu Glu Glu Arg Asp Lys Cys Glu Glu Glu Leu Ala  
180 185 190

Ala Phe Phe Ala Gly Ile Ile Glu Glu Lys Arg Asn Lys Pro Glu Gln  
195 200 205

Asp Ile Ile Ser Ile Leu Val Glu Ala Glu Glu Thr Gly Glu Lys Leu  
210 215 220

Ser Gly Glu Glu Leu Ile Pro Leu Cys Thr Leu Leu Leu Val Ala Gly  
225 230 235 240



Asn Glu Thr Thr Thr Asn Leu Ile Ser Asn Ala Met Tyr Ser Ile Leu

245

250

255

Glu Thr Pro Gly Val Tyr Glu Glu Leu Arg Ser His Pro Glu Leu Met

260

265

270

Pro Gln Ala Val Glu Glu Ala Leu Arg Phe Arg Ala Pro Ala Pro Val

275

280

285

Leu Arg Arg Ile Ala Lys Arg Asp Thr Glu Ile Gly Gly His Leu Ile

290

295

300

Lys Glu Gly Asp Met Val Leu Ala Phe Val Ala Ser Ala Asn Arg Asp

305

310

315

320

Glu Ala Lys Phe Asp Arg Pro His Met Phe Asp Ile Arg Arg His Pro

325

330

335

Asn Pro His Ile Ala Phe Gly His Gly Ile His Phe Cys Leu Gly Ala

340

345

350

Pro Leu Ala Arg Leu Glu Ala Asn Ile Ala Leu Thr Ser Leu Ile Ser

355

360

365

Ala Phe Pro His Met Glu Cys Val Ser Ile Thr Pro Ile Glu Asn Ser

370

375

380

Val Ile Tyr Gly Leu Lys Ser Phe Arg Val Lys Met





385

390

395

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 1221

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bacillus subtilis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (25)..(1212)

&lt;400&gt; 43

ctcgagtcga ggaggtcgac taat atg aac gtt ctg aac cgc cgt caa gcc 51

Met Asn Val Leu Asn Arg Arg Gln Ala

1

5

ttg cag cga gcg ctg ctc aat ggg aaa aac aaa cag gat gcg tat cat 99

Leu Gln Arg Ala Leu Leu Asn Gly Lys Asn Lys Gln Asp Ala Tyr His

10

15

20

25

ccg ttt cca tgg tat gaa tcg atg aga aag gat gcg cct gtt tcc ttt 147

Pro Phe Pro Trp Tyr Glu Ser Met Arg Lys Asp Ala Pro Val Ser Phe

30

35

40

gat gaa gaa aac caa gtg tgg agc gtt ttt ctt tat gat gat gtc aaa 195

Asp Glu Glu Asn Gln Val Trp Ser Val Phe Leu Tyr Asp Asp Val Lys

45

50

55



aaa gtt gtt ggg gat aaa gag ttg ttt tcc agt tgc atg ccg cag cag 243  
 Lys Val Val Gly Asp Lys Glu Leu Phe Ser Ser Cys Met Pro Gln Gln  
                   60                                65                                70

aca agc tct att gga aat tcc atc att aac atg gac ccg ccg aag cat 291  
 Thr Ser Ser Ile Gly Asn Ser Ile Ile Asn Met Asp Pro Pro Lys His  
                   75                                80                                85

aca aaa atc cgt tca gtc gtg aac aaa gcc ttt act ccg cgc gtg atg 339  
 Thr Lys Ile Arg Ser Val Val Asn Lys Ala Phe Thr Pro Arg Val Met  
                   90                                95                                100                                105

aag caa tgg gaa ccg aga att caa gaa atc aca gat gaa ctg att caa 387  
 Lys Gln Trp Glu Pro Arg Ile Gln Glu Ile Thr Asp Glu Leu Ile Gln  
                                 110                                115                                120

aaa ttt cag ggg cgc agt gag ttt gac ctt gtt cac gat ttt tca tac 435  
 Lys Phe Gln Gly Arg Ser Glu Phe Asp Leu Val His Asp Phe Ser Tyr  
                   125                                130                                135

ccg ctt ccg gtt att gtg ata tct gag ctg ctg gga gtg cct tca gcg 483  
 Pro Leu Pro Val Ile Val Ile Ser Glu Leu Leu Gly Val Pro Ser Ala  
                   140                                145                                150

cat atg gaa cag ttt aaa gca tgg tct gat ctt ctg gtc agt aca ccg 531  
 His Met Glu Gln Phe Lys Ala Trp Ser Asp Leu Leu Val Ser Thr Pro  
                   155                                160                                165



aag gat aaa agt gaa gaa gct gaa aaa gcc ttt ttg gaa gaa cga gat 579  
 Lys Asp Lys Ser Glu Glu Ala Glu Lys Ala Phe Leu Glu Glu Arg Asp  
 170 175 180 185

aag tgt gag gaa gaa ctg gcc gcg ttt ttt gcc ggc atc ata gaa gaa 627  
 Lys Cys Glu Glu Glu Leu Ala Ala Phe Phe Ala Gly Ile Ile Glu Glu  
 190 195 200

aag cga aac aaa ccg gaa cag gat att att tct att tta gtg gaa gcg 675  
 Lys Arg Asn Lys Pro Glu Gln Asp Ile Ile Ser Ile Leu Val Glu Ala  
 205 210 215

gaa gaa aca ggc gag aag ctg tcc ggt gaa gag ctg att ccg ttt tgc 723  
 Glu Glu Thr Gly Glu Lys Leu Ser Gly Glu Glu Leu Ile Pro Phe Cys  
 220 225 230

acg ctg ctg ctg gtg gcc gga aat gaa acc act aca aac ctg att tca 771  
 Thr Leu Leu Leu Val Ala Gly Asn Glu Thr Thr Thr Asn Leu Ile Ser  
 235 240 245

aat gcg atg tac agc ata tta gaa acg cca gcc gtt tac gag gaa ctg 819  
 Asn Ala Met Tyr Ser Ile Leu Glu Thr Pro Gly Val Tyr Glu Glu Leu  
 250 255 260 265

cgc agc cat cct gaa ctg atg cct cag gca gtg gag gaa gcc ttg cgt 867  
 Arg Ser His Pro Glu Leu Met Pro Gln Ala Val Glu Glu Ala Leu Arg  
 270 275 280

ttc aga gcg ccg gcc ccg gtt ttg agg cgc att gcc aag cgg gat acg 915



Phe Arg Ala Pro Ala Pro Val Leu Arg Arg Ile Ala Lys Arg Asp Thr  
 285 290 295

gag atc ggg ggg cac ctg att aaa gaa ggt gat atg gtt ttg gcg ttt 963  
 Glu Ile Gly Gly His Leu Ile Lys Glu Gly Asp Met Val Leu Ala Phe  
 300 305 310

gtg gca tcg gca aat cgt gat gaa gca aag ttt gac aga ccg cac atg 1011  
 Val Ala Ser Ala Asn Arg Asp Glu Ala Lys Phe Asp Arg Pro His Met  
 315 320 325

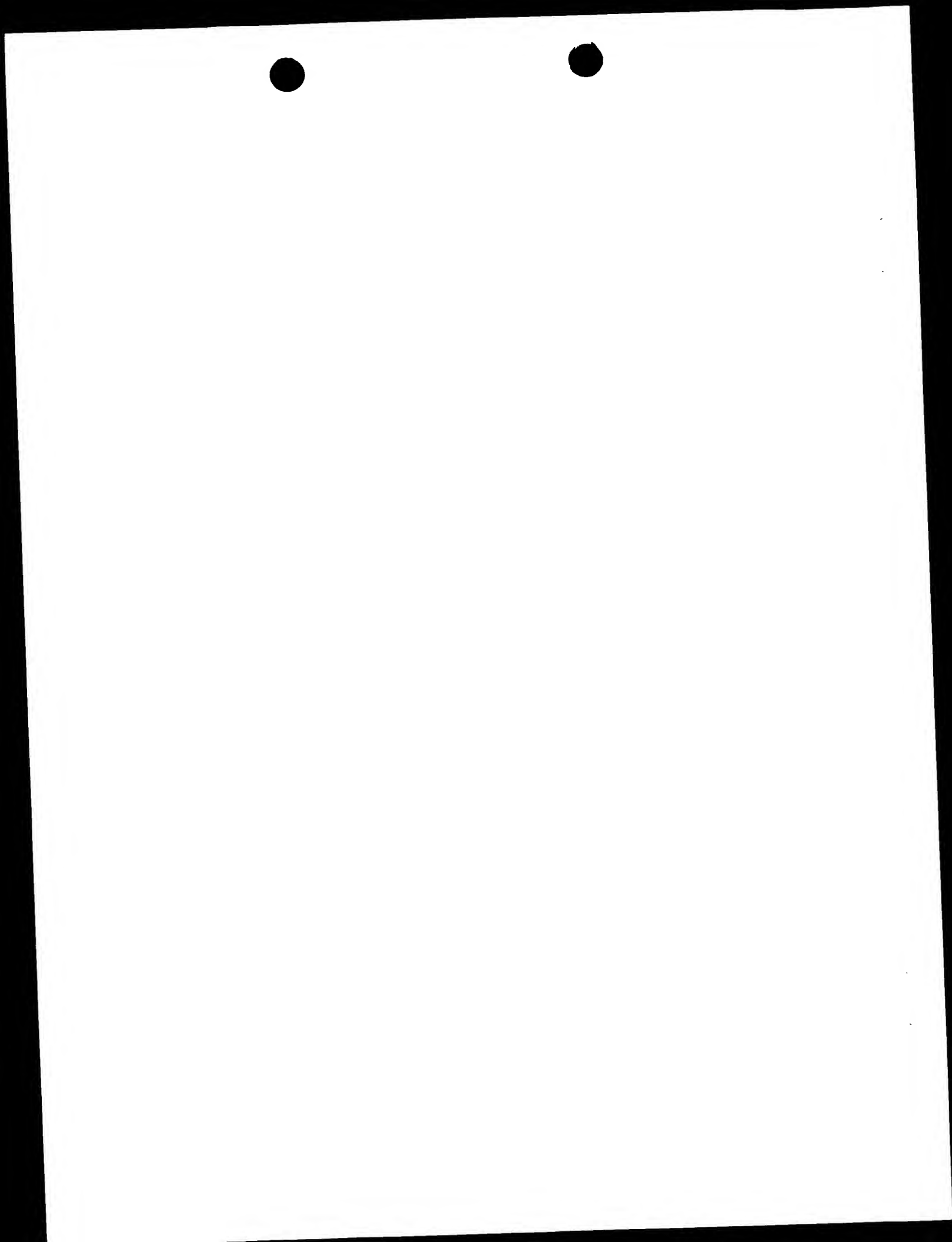
ttt gat atc cgc cgc cat ccc aat ccg cat att gcg ttt ggc cac ggc 1059  
 Phe Asp Ile Arg Arg His Pro Asn Pro His Ile Ala Phe Gly His Gly  
 330 335 340 345

atc cat ttt tgc ctt ggg gcc ccg ctt gcc cgt ctt gaa gca aat atc 1107  
 Ile His Phe Cys Leu Gly Ala Pro Leu Ala Arg Leu Glu Ala Asn Ile  
 350 355 360

gcg tta acg tct ttg att tct gct ttt cct cat atg gag tgc gtc agt 1155  
 Ala Leu Thr Ser Leu Ile Ser Ala Phe Pro His Met Glu Cys Val Ser  
 365 370 375

atc act ccg att gaa aac agt gtg ata tac gga tta aag agc ttc cgt 1203  
 Ile Thr Pro Ile Glu Asn Ser Val Ile Tyr Gly Leu Lys Ser Phe Arg  
 380 385 390

gtg aaa atg taaggatcc 1221  
 Val Lys Met





395

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 1221

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bacillus subtilis

&lt;221&gt; CDS

&lt;221&gt; (25)..(1212)

&lt;400&gt; 44

ctcgagtcga ggaggtcgac taat atg aac gtt ctg aac cgc cgt caa gcc 51

Met Asn Val Leu Asn Arg Arg Gln Ala

1

5

ttg ccg cga gcg ctg ctc aat ggg aaa aac aaa cag gat gcg tat cat 99

Leu Pro Arg Ala Leu Leu Asn Gly Lys Asn Lys Gln Asp Ala Tyr His

10

15

20

25

ccg ttt cca tgg tat gaa tgc atg aga aag gat gcg cct gtt tcc ttt 147

Pro Phe Pro Trp Tyr Glu Ser Met Arg Lys Asp Ala Pro Val Ser Phe

30

35

40

gat gaa gaa aac caa gtg tgg agc gtt ttt ctt tat gat gat gtc aaa 195

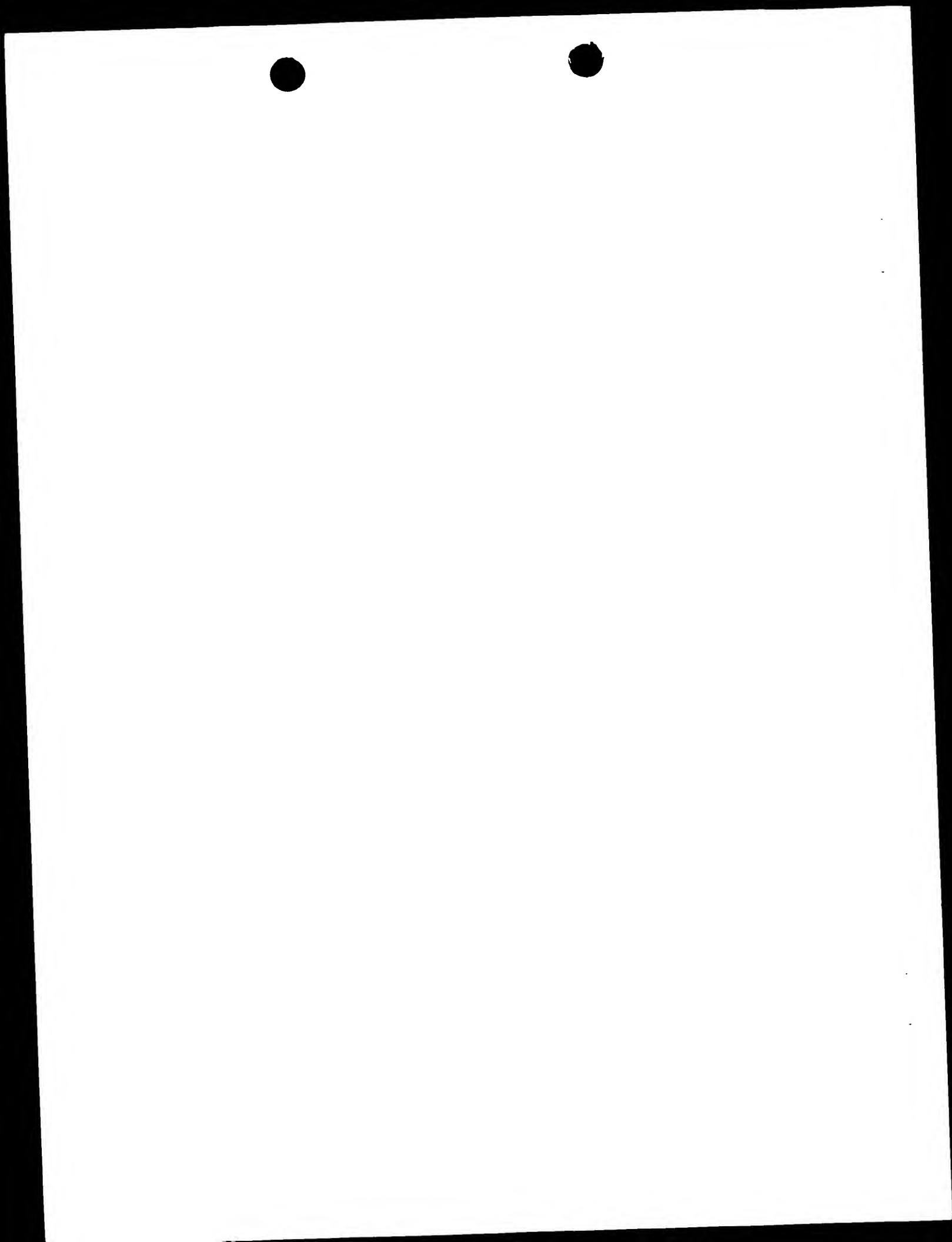
Asp Glu Glu Asn Gln Val Trp Ser Val Phe Leu Tyr Asp Asp Val Lys

45

50

55

aaa gtt gtt ggg gat aaa gag ttg ttt tcc agt tgc atg ccg cag cag 243



Lys Val Val Gly Asp Lys Glu Leu Phe Ser Ser Cys Met Pro Gln Gln  
                   60                  65                  70

aca agc tct att gga aat tcc atc att agc atg gac ccg ccg aag cat 291  
 Thr Ser Ser Ile Gly Asn Ser Ile Ile Ser Met Asp Pro Pro Lys His  
           75                  80                  85

aca aaa atc cgt tca gtc gtg aac aaa gcc ttt act ccg cgc gcg atg 339  
 Thr Lys Ile Arg Ser Val Val Asn Lys Ala Phe Thr Pro Arg Ala Met  
       90                  95                  100                  105

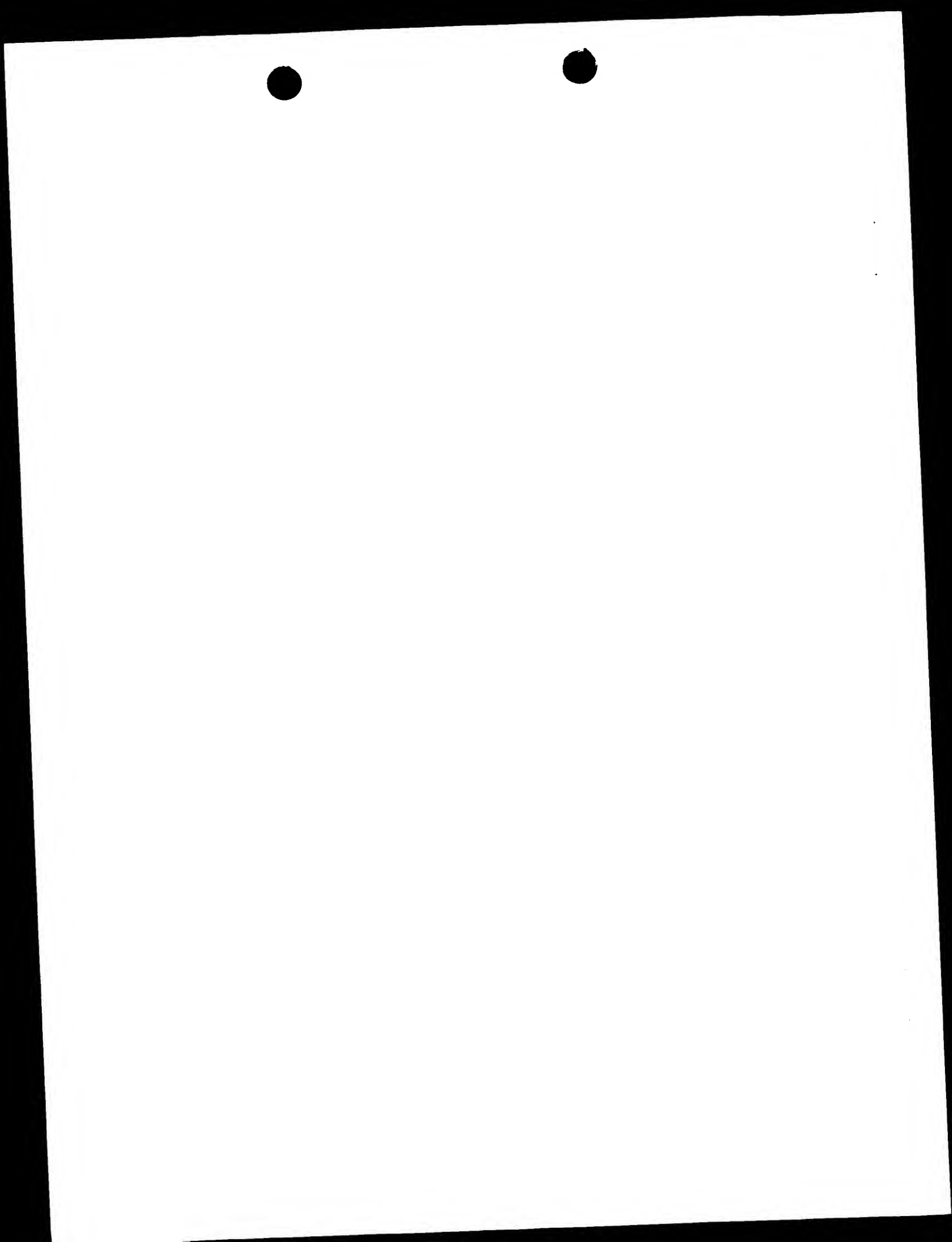
aag caa tgg gaa ccg aga att caa gaa atc aca gat gaa ctg att caa 387  
 Lys Gln Trp Glu Pro Arg Ile Gln Glu Ile Thr Asp Glu Leu Ile Gln  
                   110                  115                  120

aaa ttt cag ggg cgc agt gag ttt gac ctt gtt cac gat tat tca tac 435  
 Lys Phe Gln Gly Arg Ser Glu Phe Asp Leu Val His Asp Tyr Ser Tyr  
           125                  130                  135

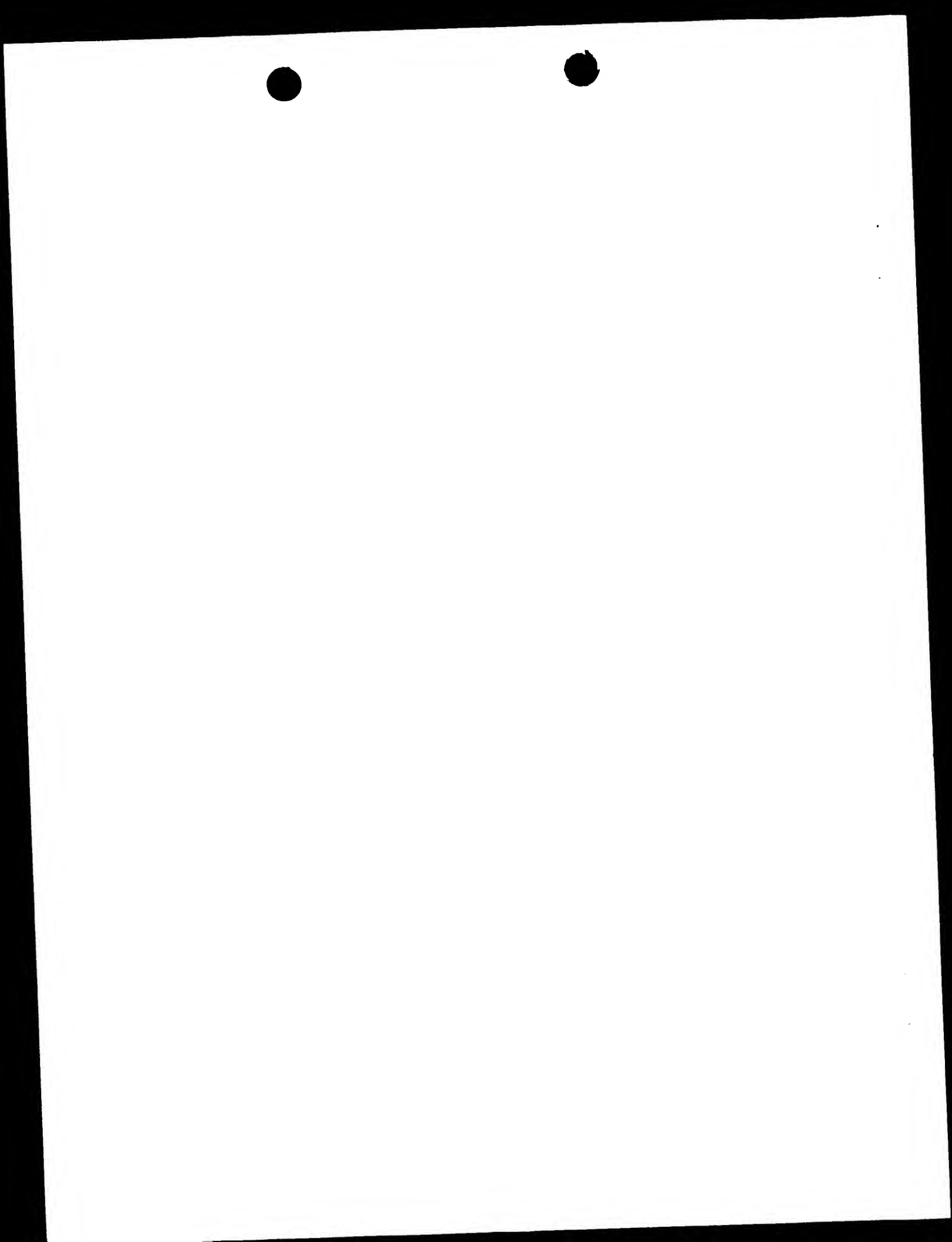
ccg ctt ccg gtt att gtg ata tct gag ctg ctg gga gtg cct tca gcg 483  
 Pro Leu Pro Val Ile Val Ile Ser Glu Leu Leu Gly Val Pro Ser Ala  
           140                  145                  150

cat atg gaa cag ttt aaa gca tgg tct gat ctt ctg gtc agt aca ccg 531  
 His Met Glu Gln Phe Lys Ala Trp Ser Asp Leu Leu Val Ser Thr Pro  
           155                  160                  165

aag gat aaa agt gaa gaa gct gaa aaa gcc ttt ttg gaa gaa cga gat 579  
 Lys Asp Lys Ser Glu Glu Ala Glu Lys Ala Phe Leu Glu Glu Arg Asp



170	175	180	185
aag tgt gag gaa gaa ctg gcc gcg ttt ttt gcc ggc atc ata gaa gaa 627			
Lys Cys Glu Glu Glu Leu Ala Ala Phe Phe Ala Gly Ile Ile Glu Glu			
190	195	200	
aag cga aac aaa ccg gaa cag gat att att tct att tta gtg gaa gcg 675			
Lys Arg Asn Lys Pro Glu Gln Asp Ile Ile Ser Ile Leu Val Glu Ala			
205	210	215	
gaa gaa aca ggc gag aag ctg tcc ggt gaa gag ctg att ccg ttg tgc 723			
Glu Glu Thr Gly Glu Lys Leu Ser Gly Glu Glu Leu Ile Pro Leu Cys			
220	225	230	
acg ctg ctg ctg gtg gcc gga aat gaa acc act aca aac ctg att tca 771			
Thr Leu Leu Leu Val Ala Gly Asn Glu Thr Thr Thr Asn Leu Ile Ser			
235	240	245	
aat gcg atg ttc agc ata tta gaa acg cca ggc gtt tac gag gaa ctg 819			
Asn Ala Met Phe Ser Ile Leu Glu Thr Pro Gly Val Tyr Glu Glu Leu			
250	255	260	265
cgc agc cat cct gaa ctg atg ccc cag gca gtg gag gaa gcc ttg cgt 867			
Arg Ser His Pro Glu Leu Met Pro Gln Ala Val Glu Glu Ala Leu Arg			
270	275	280	
ttc aga gcg ccg gcc ccg gtt ttg agg cgc att gcc aag cgg gat acg 915			
Phe Arg Ala Pro Ala Pro Val Leu Arg Arg Ile Ala Lys Arg Asp Thr			
285	290	295	



gag atc ggg ggg cac ctg att aaa gaa ggt gat acg gtt ttg gcg ttt 963  
Glu Ile Gly Gly His Leu Ile Lys Glu Gly Asp Thr Val Leu Ala Phe  
300 305 310

gtg gca tcg gca aat cgt gat gaa gca aag ttt gac aga ccg cac atg 1011  
Val Ala Ser Ala Asn Arg Asp Glu Ala Lys Phe Asp Arg Pro His Met  
315 320 325

ttt gat atc cgc cgc cat ccc aat ccg cat att gcg ttt ggc cac ggc 1059  
Phe Asp Ile Arg Arg His Pro Asn Pro His Ile Ala Phe Gly His Gly  
330 335 340 345

atc cat ttt tgc ctt ggg gcc ccg ctt gcc cgt ctt gaa gca aat atc 1107  
Ile His Phe Cys Leu Gly Ala Pro Leu Ala Arg Leu Glu Ala Asn Ile  
350 355 360

gcg tta acg tct ttg att tct gct ttt cct cat atg gag tgc gtc agt 1155  
Ala Leu Thr Ser Leu Ile Ser Ala Phe Pro His Met Glu Cys Val Ser  
365 370 375

atc act ccg att gaa aac agt gtg ata tac gga tta aag agc ttc cgt 1203  
Ile Thr Pro Ile Glu Asn Ser Val Ile Tyr Gly Leu Lys Ser Phe Arg  
380 385 390

gtg aaa atg taaggatcc 1221  
Val Lys Met  
395





&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 396

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus subtilis

&lt;400&gt; 45

Met Asn Val Leu Asn Arg Arg Gln Ala Leu Pro Arg Ala Leu Leu Asn

1

5

10

15

Gly Lys Asn Lys Gln Asp Ala Tyr His Pro Phe Pro Trp Tyr Glu Ser

20

25

30

Met Arg Lys Asp Ala Pro Val Ser Phe Asp Glu Glu Asn Gln Val Trp

35

40

45

Ser Val Phe Leu Tyr Asp Asp Val Lys Lys Val Val Gly Asp Lys Glu

50

55

60

Leu Phe Ser Ser Cys Met Pro Gln Gln Thr Ser Ser Ile Gly Asn Ser

65

70

75

80

Ile Ile Ser Met Asp Pro Pro Lys His Thr Lys Ile Arg Ser Val Val

85

90

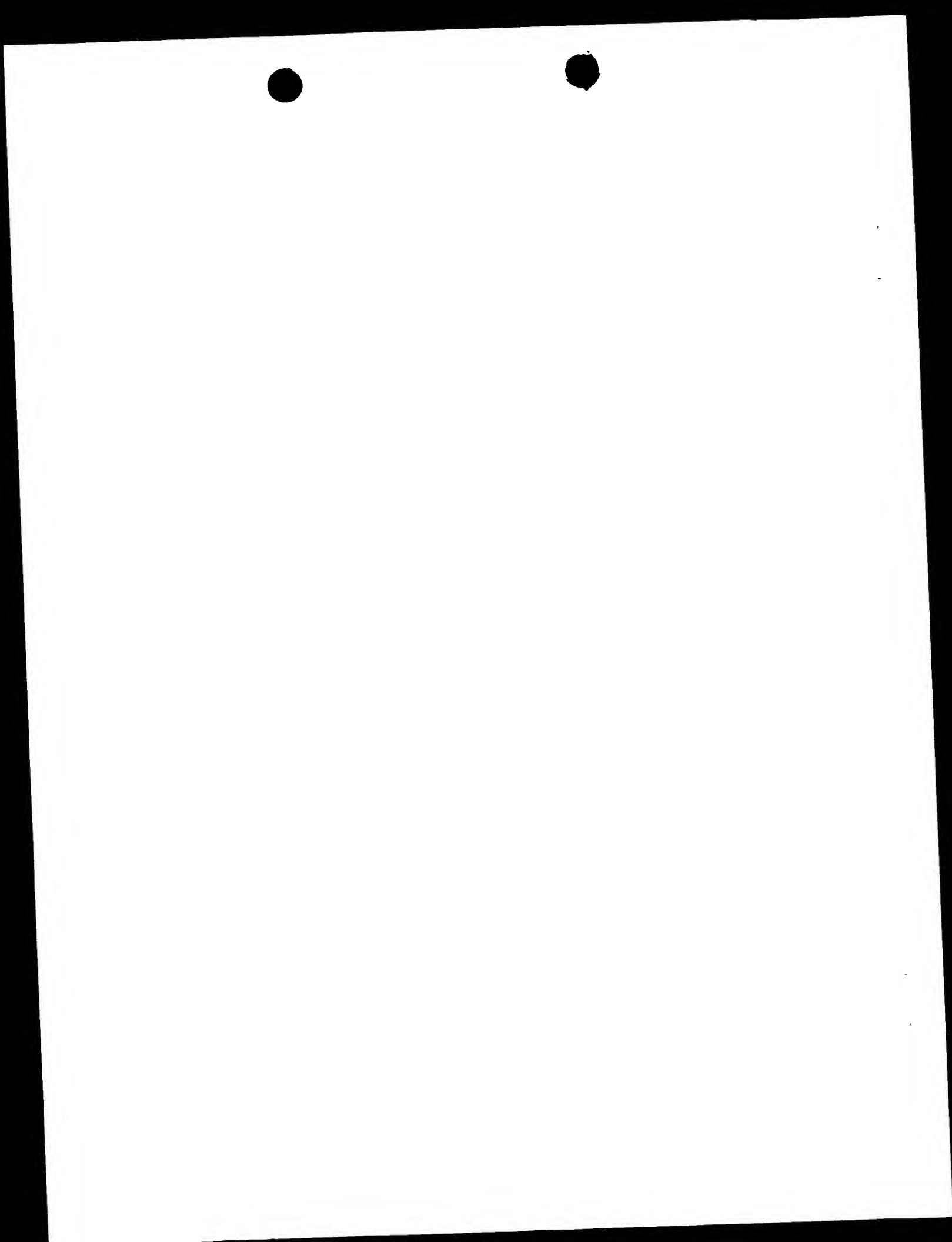
95

Asn Lys Ala Phe Thr Pro Arg Ala Met Lys Gln Trp Glu Pro Arg Ile

100

105

110



Gln Glu Ile Thr Asp Glu Leu Ile Gln Lys Phe Gln Gly Arg Ser Glu  
115 120 125

Phe Asp Leu Val His Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Pro Val Ile Val Ile  
130 135 140

Ser Glu Leu Leu Gly Val Pro Ser Ala His Met Glu Gln Phe Lys Ala  
145 150 155 160

Trp Ser Asp Leu Leu Val Ser Thr Pro Lys Asp Lys Ser Glu Glu Ala  
165 170 175

Glu Lys Ala Phe Leu Glu Glu Arg Asp Lys Cys Glu Glu Glu Leu Ala  
180 185 190

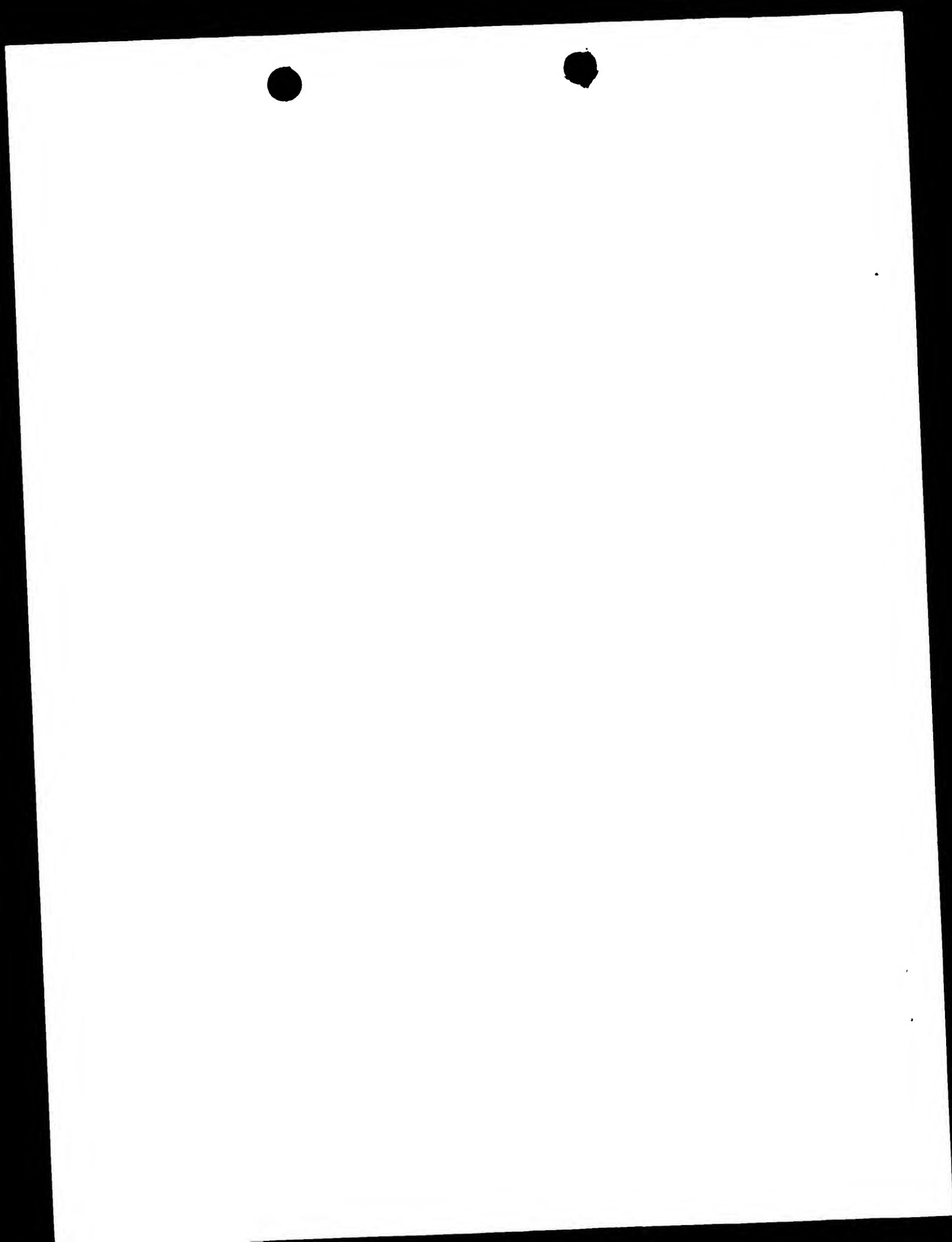
Ala Phe Phe Ala Gly Ile Ile Glu Glu Lys Arg Asn Lys Pro Glu Gln  
195 200 205

Asp Ile Ile Ser Ile Leu Val Glu Ala Glu Glu Thr Gly Glu Lys Leu  
210 215 220

Ser Gly Glu Glu Leu Ile Pro Leu Cys Thr Leu Leu Leu Val Ala Gly  
225 230 235 240

Asn Glu Thr Thr Thr Asn Leu Ile Ser Asn Ala Met Phe Ser Ile Leu  
245 250 255

Glu Thr Pro Gly Val Tyr Glu Glu Leu Arg Ser His Pro Glu Leu Met  
260 265 270



Pro Gln Ala Val Glu Glu Ala Leu Arg Phe Arg Ala Pro Ala Pro Val

275

280

285

Leu Arg Arg Ile Ala Lys Arg Asp Thr Glu Ile Gly Gly His Leu Ile

290

295

300

Lys Glu Gly Asp Thr Val Leu Ala Phe Val Ala Ser Ala Asn Arg Asp

305

310

315

320

Glu Ala Lys Phe Asp Arg Pro His Met Phe Asp Ile Arg Arg His Pro

325

330

335

Asn Pro His Ile Ala Phe Gly His Gly Ile His Phe Cys Leu Gly Ala

340

345

350

Pro Leu Ala Arg Leu Glu Ala Asn Ile Ala Leu Thr Ser Leu Ile Ser

355

360

365

Ala Phe Pro His Met Glu Cys Val Ser Ile Thr Pro Ile Glu Asn Ser

370

375

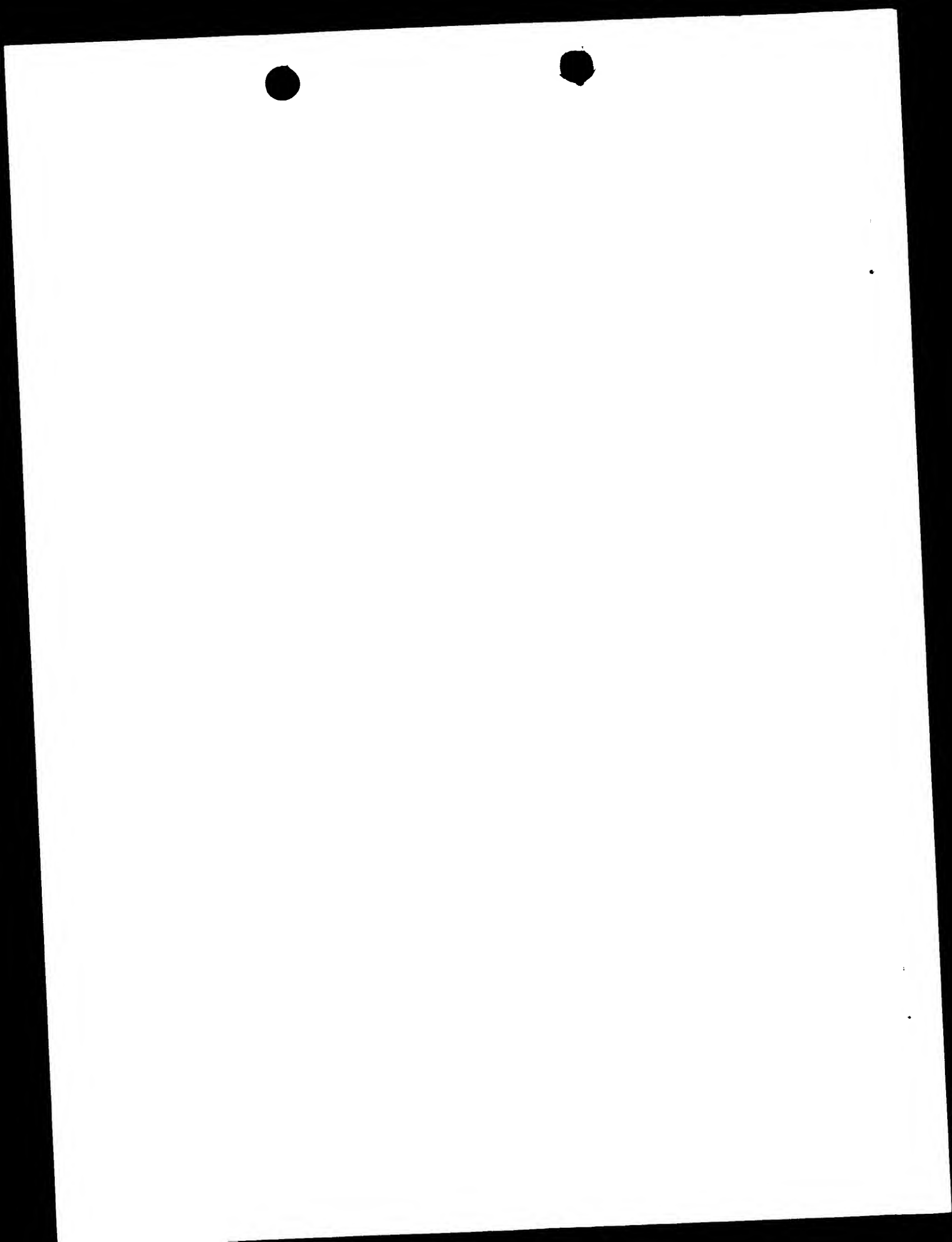
380

Val Ile Tyr Gly Leu Lys Ser Phe Arg Val Lys Met

385

390

395



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00472

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N9/02, 1/21, 15/53, C12P7/62, 17/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N9/00-9/02, 15/52-15/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq,  
BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Nature, Volume 390, issued November 20, 1997, F. Kunst et al., "The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium <i>Bacillus subtilis</i> ", pages 249-256 & Database GenBank Accession No.B69851	1-24,39
X	Microbiology, Volume 144, Part 4, issued April 1998, Cario Rivolta et al., "A 35 · 7 kb DNA fragment from the <i>Bacillus subtilis</i> chromosome containing a putative 12 · 3 kb operon involved in hexuronate catabolism and a perfectly symmetrical hypothetical catabolite-responsive element", pages 877-884 & Database GenBank Accession No.AF015825	1-24,39
A	EP, 649907, A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY), 26 April, 1995 (26.04.95) & HU, 217104, B & AU, 9475972, A & FI, 9404926, A & CA, 2134025, A & JP, 7-184670, A & CN, 1106067, A & IL, 111084, A & SG, 47504, A1	1-39

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
27 April, 2000 (27.04.00)Date of mailing of the international search report  
16 May, 2000 (16.05.00)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00472

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 64-2585, A (SANKYO COMPANY, LIMITED), 06 January, 1989 (06.01.89) (Family: none)	1-39
A	Cardiology, Volume 77, Supplement 4, issued October 1990, Alfred W. Alberts, "Lovastatin and Simvastatin - Inhibitors of HMG CoA Reductase and Cholesterol Biosynthesis", pages 14-21	1-39
A	The Journal of Antibiotics, Volume 29, Number 12, issued December 1976, Akira Endo et al., "ML-236A, ML-236B, AND ML-236C, NEW INHIBITORS OF CHOLESTEROGENESIS PRODUCED BY PENICILLIUM CITRINUM", pages 1346-1348	1-39



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N9/02, 1/21, 15/53, C12P7/62, 17/06

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N9/00-9/02, 15/52-15/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq,  
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Nature, Volume 390, issued November 20, 1997, F. Kunst et al., "The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium <i>Bacillus subtilis</i> ", pages 249-256 & Database GenBank Accession No. B69851	1-24, 39
X	Microbiology, Volume 144, Part 4, issued April 1998, Cario Rivolta et al., "A 35.7 kb DNA fragment from the <i>Bacillus subtilis</i> chromosome containing a putative 12.3 kb operon involved in hexuronate catabolism and a perfectly	1-24, 39

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27.04.00

国際調査報告の発送日

16.05.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

印

4N

8214

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	symmetrical hypothetical catabolite-responsive element", pages 877-884 & Database GenBank Accession No. AF015825	
A	EP, 649907, A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 26.4月.1995 (26.04.95) & HU, 217104, B & AU, 9475972, A & FI, 9404926, A & CA, 2134025, A & JP, 7-184670, A & CN, 1106067, A & IL, 111084, A & SG, 47504, A1	1-39
A	JP, 64-2585, A (三共株式会社) 6.1月.1989 (06.01.89) (ファミリーなし)	1-39
A	Cardiology, Volume 77, Supplement 4, issued October 1990, Alfred W. Alberts, "Lovastatin and Simvastatin - Inhibitors of HMG CoA Reductase and Cholesterol Biosynthesis", pages 14-21	1-39
A	The Journal of Antibiotics, Volume 29, Number 12, issued December 1976, Akira Endo et al., "ML-236A, ML-236B, AND ML-236C, NEW INHIBITORS OF CHOLESTEROGENESIS PRODUCED BY <i>PENICILLIUM CITRINUM</i> ", pages 1346-1348	1-39